



HAL
open science

Lactuca sativa L. : Evaluation écotoxicologique de rejets industriels complexes et de solutions synthétiques

Anne Priac

► **To cite this version:**

Anne Priac. Lactuca sativa L. : Evaluation écotoxicologique de rejets industriels complexes et de solutions synthétiques. Ecologie, Environnement. Université de Franche-Comté, 2014. Français. NNT : 2014BESA2049 . tel-01228010

HAL Id: tel-01228010

<https://theses.hal.science/tel-01228010v1>

Submitted on 12 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
U.F.R. SCIENCES ET TECHNIQUES
Laboratoire Chrono-Environnement (UMR 6249 CNRS/UFC usc INRA)

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Franche-Comté
Spécialité : Sciences de la Vie et de l'Environnement
Ecole Doctorale : Environnements – Santé

LACTUCA SATIVA L. : EVALUATION ECOTOXICOLOGIQUE DE REJETS INDUSTRIELS COMPLEXES ET DE SOLUTIONS SYNTHETIQUES

Par

Anne PRIAC

Le 27 Novembre 2014, devant un jury composé de :

Pierre-Marie BADOT, Professeur, Université de Franche-Comté	<i>Président Rapporteur</i>
Grégorio CRINI, Chercheur, Université de Franche-Comté	<i>Directeur</i>
Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE, Professeur, AgroParisTech, INRA	<i>Rapporteur</i>
Christelle SIMON-COLIN, Chercheur, LM2E, IFREMER	<i>Rapporteur</i>
Badr ALAOUI-SOSSE, Maître de Conférences, Université de Franche-Comté	<i>Examineur</i>
Robert HAUSLER, Professeur, Ecole de Technologie Supérieure, Montréal	<i>Examineur</i>
Sophie GAVOILLE, Chargée de mission, Agence de l'Eau	<i>Invitée</i>
François GHILLEBAERT, Expert écotoxicologue, Cabinet ECOTOX	<i>Invité</i>

“ Mais les graines sont invisibles. Elles dorment dans le secret de la Terre jusqu’à ce qu’il prenne à l’une d’elles la fantaisie de se réveiller, alors elle s’étire et pousse timidement vers le soleil une ravissante petite brindille inoffensive.”

A. de Saint Exupéry

“ Il y a trois choses qu’une femme est capable de réaliser avec rien : un chapeau, une salade et une scène de ménage.”

M. Twain

“ Les peuples les plus civilisés sont aussi voisins de la barbarie que le fer poli l’est de la rouille. Les peuples, comme les métaux, n’ont de brillant que les surfaces.”

A. de Rivarol

“ Un hamster de laboratoire dit à un congénère : j’ai dressé le savant. Chaque fois que j’appuie sur ce bouton, il m’apporte des graines.”

B. Werber

“ Sylvie va au marché. Elle a 165 francs dans son porte-monnaie. Elle achète 9 laitues à 3,20 francs et 14 laitues à 3,10 francs. Est-ce bien raisonnable ?”¹

P. Desproges

“ J’avance que la vue d’une graine dans sa gousse mettrait en déroute le savoir de tous les temps.”

W. Whitman

“ L’Homme porte en lui la semence de tout bonheur et de tout malheur.”

Sophocle

*“I can't believe that really my time has come,
I don't feel ready, there's so much left undone.”*

Iron Maiden

¹ Soient, respectivement, 31.31, 0.61 et 0.59 euros. ☺

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier les personnes ayant accepté de faire partie du jury d'évaluation de cette thèse : Mmes. Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE, et Christelle SIMON-COLIN, et MMs. Badr ALAOUI-SOSSE, Pierre-Marie BADOT, et Robert HAUSLER. J'espère que vous serez aussi intéressés à lire et à entendre parler de mes salades que je l'ai été à les martyriser. Je remercie également Mme Sophie GAVOILLE et Mr François GHILLEBAERT.

Je me dois également de remercier mon encadrant et directeur de thèse Mr Grégorio CRINI, Docteur-Ingénieur d'études au Laboratoire Chrono-Environnement de Besançon, de m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe de recherche (à l'époque 100% masculine), et de m'avoir permis de progresser au cours de ce doctorat dans de bonnes conditions ! Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité exceptionnelle de partir 4 mois au pays de l'accent chantant. C'est la raison pour laquelle je tiens à remercier sincèrement le Pr Robert HAUSLER, Directeur de la Station Expérimentale des Procédés Pilotes en Environnement de l'Ecole de Technologie Supérieure de Montréal au Québec, ainsi que Maria CENDAN, Dan, Guillaume, JB, Jérémie, Mirella, Charles, Mickaël, Eva et Amélie, de leur accueil, de leur aide et de leur sympathie ! J'ai à cette occasion une pensée pour Danielle BONENFANT.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans le soutien financier de la Ville de Besançon, de l'Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée & Corse, et du Fond Européen de Développement Régional (FEDER). Je remercie également les industriels qui ont bien voulu se prêter au jeu du "et si je donnais à boire vos rejets à mes salades ?" : MM. Claude BINETRUY et Jocelyn PAILLET (Fralsen, Besançon), et MM. Alexandre CORDONNIER et Philippe ANTOINE (Groupe Galvanoplast, Lure).

Je remercie sincèrement l'intégralité de la *water team* (de plus en plus féminine) pour ses analyses, ses coups de mains et de rires, ses conseils, j'ai nommée Nadia MORIN-CRINI, Caroline AMIOT, Coline DRUART, Amandine-ma-stagiaire POUPENEY et Elise-l-expatriée EUVRARD. Je n'oublie pas non plus mes deux-ex-co-locataires-doctorants Jérémie CHARLES et Bertrand SANCEY, qui même après avoir soutenu leur thèse, sont restés attentifs à la mienne :)

La vie d'un(e) doctorant(e) ne se limite *heureusement* pas à quelques m² de paillasse : il y a une vie dans (si si) et hors (si si²) du labo. C'est la raison pour laquelle je ne peux pas ne pas remercier de nombreuses personnes au passeport parfois bien tamponné.

de Brest : mes SeaTiZen, SBM & IUEM mates, Aurore Pti Clou, Marie, mes M&M's préférés, Eric & Nat. Mais aussi les enseignants qui m'ont (nous ont) suivis dès la licence pour certains d'entre nous, entre autres Phillipe Pondaven, Fred Jean, Jacques Clavier, Erwan ArGall, Anne Lorrain, ... (Et aussi Denis Poinot à Rennes et Steven Campana de Dartmouth :D) Tous ont participé à me faire continuer de penser que *Science rocks* !

de Banyuls : la colo del Sid version étendue avec Noémie, Aurélie, Bénédicte, Virginie, Maître Splinter & Alex...Sans oublier ze Love Boat !

du reste de la Bretagne : la dream team de Vivarmor et de la Réserve Naturelle de la Baie de Saint-Brieuc, je reviens faire du tri de benthos, et des tests comètes quand vous voulez ! Morgane et Nico, pour leurs envies de voyages contagieuses, leur maison cocon et leur collec' de jouets Kinder. Léna ma polka fellow, pour m'avoir quasi-inscrite en 10 minutes et par

téléphone au folk bisontin et pour m'avoir fait suer et sprinter là où Louis-croix-bâton-vé se baladait pépouze. Ma ptite Virginie Jolie, gros bisous à toi aussi. Estelle & Elodie pour leur culture métallique sans bornes ♪ Et Kro-Line, tu pourrais presque avoir ton nom dans le titre de ma thèse :D Je n'oublie surtout pas la super Maman (et le super Papa) de ma pitite Enora que j'aime : ASo, merci d'avoir frôlé la dépression auditive en même temps que les arbres de la forêt de Paimpont en me téléphonant entre le bureau et chez vous !

de Moorea, je voudrais remercier très fort ma Tati Mag', mes copines boxeuses-danceuses-nageuses, non pas les tortues, mais Cris et Val, toute l'Equipe de Te mana o te moana et du Dolfin...les enfants préparez vous, je reviens dans pas longtemps ! Aussi, comment ne pas faire une énorme bise à Mirta-mon-amour et Mélo !!

de Saint Jean de Monts : CAP un jour et CAP toujours, ou le sentiment d'être chez soi sous une tente, avec peu de sommeil, des ados prêts à s'éclater et des anim' exceptionnels ! J'en reveux !! et des mercis il y en rena pour Nico l'irlo, Prisca :), Charles et Nico grâce à qui je ne suis jamais seule au rayon pâté, AlRice, le Seb, La Manoeche, JC, Gomar, Théogarou, Laulau, Gérard, Noellie, et bien sur les jeunes !! (bise à ma ptite Cam Chaize, Corentin et Lilian)

de Montréal, Moorea et de Bretagne (nous sommes partout) : Ma chère Marguerite-Bénédicte, merci, parce que sans toi, Montréal, mais aussi ma thèse, n'auraient pas été les même ! Je t'embrasse fort. Merci aussi à ton geek de chéri Christophe, ma swimming fellow et fournisseuse en thé (d'ailleurs je n'en ai presque plus) Audrey, ma super cute cheum de fille Cha et toute sa gang ! Tu m'avais manqué ! Mon infirmière bretonno-québécoise préférée Estelle, et aussi parce que le monde est tout petit, merci aussi à Jérémy, Sandrine & Olivier.

de NouilleOrqueSixTees : Léna & Marion (je te mets dans la catégorie NYC, c'est plus glam' que Vesoul 3:)), parce que passer 12h debout, dans le froid, sans boire ou manger ET réussir à jouer à la bataille, garder le sourire et chanter *New York New York* pendant trois jours, ça a été possible grâce à vous !

de Brest, Paris, Moorea, Besançon & Bayonne : une case rien que pour toi ma fillote !! Merci !! Parce qu'*Ohana* veut dire famille, et que marraine/fillote c'est la famille !

Dans les *special'guests* de ces remerciements, je voudrais remercier Mr Tapette & Mr Enc****r de poules et sa Dame. Parce que depuis Brest, Océanopolis et le Cercle des Pouetpouet disparus, on ne s'est jamais vraiment quittés et que je vous aime très beaucoup fort.

De Malte, Paris, l'Inde, Pékin, Cahors, Milan(?) Comment te remercier plus qu'en te disant merci ? MaNièce, mercimerci, merci par Skype, par mail, par conversations dans la cuisine, en terrasse, par téléphone...Je t'embrasse très fort, tes deux schtroumphs, JM et tes parents bien sûr !!

De Franche-Comté Land & Besançon Beach (enfin !) Si j'ai bien été recrutée en été, je n'ai commencé à découvrir cette région et cette ville, que l'on ne situe sur la carte que lorsque l'on doit y aller ;), qu'à la fin d'automne. Je remercie tous les gens qui m'ont aidée à supporter ce choc climatogéographique, *i.e.* principalement mes *doc-slaves fellow, the Expendables* de la relève de la recherche en France (si vous avez des postes libres, vous pouvez les contacter) ! *Merci* à Tonton Picon, SteffiRocchiBonchour et Papi Fab d'avoir si facilement compris le phénomène des vents thermiques ! *Thank you* à JeanClaudeCagouilles d'être venu, en hiver, à vélo, au Mont Velu nous apporter à tous 25 cm de bonheur ! *Mèsi* à Leslie, de m'avoir fait me souvenir qu'une vache ça a des cornes, que ça court et que ça fait peur ! *Gracias* à la FJC

Team 2012, Steffi, Leslie, Moha, Alex, Tristan, Pierre, Olivier, Charlotte (elle habite où ?) & Zeinaba ! *Danke* à Pierloche et Ben pour les soir...pour les journées jeux (ah ! un zAmbi !) ! *Trugarez* à mes *swimming fellow* (oui j'en ai partout) Severine et LF ! *Choukran beaucoup* à Victor pour les sorties pêche et mes mimines gelées !

Un labo, ce n'est pas que des doctorants, c'est aussi...tout plein de monde, alors sans distinction, ni ordre de grandeur, pour plein de raisons, un merci, un bisou, ou les deux à Ma ptite Clairette et sa tentative de me remettre au ukulélé, Axelle (tu n'oublieras pas de déclarer ma charge de secrétaire personnelle stp), Marlène, Dom, Anne-Claude, Adeline (Mme la présidente), Adrien, Samuel, ASo la postdoc, ASo l'estropiée, Flavien, Fatna, Pauline, Audrey & Etienne, Geoff le bizut, Geoffrey-qui-décroche-même-si-c'est-moi-qui-appelle, Patrick qui a mis à mal mes muscles Pépégistes, Manon, Renaud, Patrick, Nico vdB, Mika, Francis, Clem, Eve, Bruno (même si je restais tard à Leclerc), Carlos (quand je suis arrivée très tôt à la Bouloie), Anne-Lise *the snail slayer*, Damien (croise les doigts), Lotfi pour avoir réussi à me rebaptiser plusieurs fois, Fred (merci merci !!), Maxime à qui je vais construire un autel de la BD en piqué diagonal, *et al.*, 2011-2014, tous les autres que j'oublie sûrement, et je m'en excuse !! Des remerciements façon puzzle aussi à tous les chercheurs avec lesquels j'ai pu échanger lors de réunions, congrès, workshop *etc.* Merci aussi à Fred, Véronika, à la Maison du Bonheur et mes partenaires du folk !

Je voudrais dire, écrire...exprimer un très gros merci à mon substitut préféré, ma Zoe-Linn franc-comtoise, ma *writing fellow* :) Ce fut un plaisir de rédiger, rire, angoisser, décompresser en musique en ta compagnie, je refais une fin de thèse comme ça quand tu veux ! Maintenant tu te dépêches de soutenir, on a le Château de Joux à visiter !

Je vous assure que c'est bientôt fini

Ma chère Virginie *aka* Ouaich Mabouille, comment ne pas remercier ma plus vieille cousine (1664 représente) ? Je t'embrasse fort ! A ton tour à Nantes ! On ira boire un cappuccinooo :)

Je remercie ma *grande* famille, grand-mère, oncles, tantes, cousins, cousines, ptis cousins, ptites cousines, d'avoir gardé, même de loin *and beyond*, un oeil bienveillant à mes progrès.

Je remercie aussi (!) ma *petite* famille : mes parents de m'avoir TOUJOURS supportée, encouragée, motivée, réconfortée (mais pas trop...j'suis pas en sucre !) et éveillée depuis un certain soir de juin 1984, ma sœur, parce que c'est mon PS à moi et que je l'aime, et mon beauf, parce que je suis obligée ;)

Enfin, je voudrais remercier Guigui le Gentil et...moi...d'avoir toujours été fidèle à la petite fille de 5 ans très curieuse de tout que j'étais (que je suis ?) et de m'avoir fait garder à l'esprit tout au long de ces années que *pourquoi pas, ça ira et ya pas de raison.*

Maintenant, place aux résultats...Les grandes personnes, ça aime les chiffres :)

SOMMAIRE GENERAL

<i>Remerciements</i>	5
<i>Liste des Tableaux</i>	9
<i>Liste des Figures</i>	11
<i>Liste des Annexes</i>	13
<i>Notations</i>	14
<i>Avant-Propos</i>	16
Introduction	17
Section I – Etat de l’art	27
<i>Chapitre 1 : Rejets</i>	31
<i>Chapitre 2 : Ecotoxicologie</i>	41
<i>Chapitre 3 : Lactuca sativa (L.)</i>	61
Section II – Méthodologie – Test avec Lactuca sativa	81
<i>Chapitre 1 : Variabilité des réponses écotoxicologiques : Approche Méthodologique</i>	84
<i>Chapitre 2 : Variabilité des réponses écotoxicologiques : Approche Physiologique</i>	98
<i>Chapitre 3 : Etude Préliminaire I : Déchets Solides</i>	115
<i>Chapitre 4 : Etude Préliminaire I : Régénération</i>	125
Section III – Solutions Synthétiques – Mono- & Poly- Contaminées	135
<i>Chapitre 1 : Solutions monométalliques</i>	139
<i>Chapitre 2 : Mélanges polymétalliques</i>	145
<i>Chapitre 3 : « Ecotoxicoresponsable »</i>	157
Section IV – Discussion Générale	215
Section V – Annexes	223
<i>Tableaux et Figures</i>	224
<i>Glossaire</i>	239
<i>Communications scientifiques</i>	247
<i>Résumé</i>	250

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 0.1. Valeurs limites des émissions des principaux polluants dans l'eau pour la filière TS.

Section I – Etat de l'art

Tableau I.1. Exemples de listes de Substances Dangereuses SD potentiellement présentes dans les rejets aqueux de différents secteurs industriels. L'accent est mis sur les SD métalliques, présentées en **couleur**.

Tableau I.2. Nature des principales substances chimiques présentes dans les différents types d'effluents selon l'opération de traitement.

Tableau I.3. Liste des substances prises en compte dans la caractérisation de l'état des eaux.

Tableau I.4. : Récapitulatif des différentes modalités de réalisation d'essais écotoxicologiques.

Tableau I.5. Récapitulatif des différents types de polluants existants et de leurs effets biologiques.

Tableau I.6. Liste non exhaustive et synthétique des rôles physiologiques et morphologiques, directs ou indirects des 7 ETMs considérés ETMpt pour les végétaux.

Tableau I.7. Liste synthétique et non exhaustive des effets délétères des ETMs (ETMPT et ETMss) sur les plantes.

Section II – Méthodologie

Table II.1. Major advantages of phytotoxicity assays using vascular plant seeds.

Table II.2. Non-exhaustive list of parameters that remain variable in seed germination bioassays.

Table II.3. Main environmental issues encountered by the two surface treatment companies and the regulatory values (in mg L⁻¹) for different pollutants contained in the water discharges.

Table II.4. Parameters assessed here.

Table II.5. Comparison between germination rate GR and root length RL means (\pm SD; n=3) of *L. sativa* var Batavia dorée de printemps (B) watered with four different control waters (E, UPW, ROW, DW).

Table II.6. Comparison between germination rate GR and root length RL means (\pm SD; n=3) of 4 lettuce cultivars watered with ROW.

Table II.7. Number of seeds per Petri dish versus germination rate GR (%), root and total lengths RL and TL (mm) of *L. sativa* var B (n=3 replicates).

Table II.8. Physicochemical characteristics of 3 discharge waters (Co1S1, Co2S1, Co3S1) from the 3 industrial sites investigated in this study (all concentrations are expressed in mg L⁻¹, except the conductivity in μ S cm⁻¹).

Table II.9. Germination rate, EC₅₀ and germination index values for the four lettuce cultivars watered with the four effluent samples.

Tableau II.10. Facteurs d'influence sur la sensibilité des bio-essais.

Table II.11. Metals concentrations in the discharge waters from Co1 and Co2 industries (mg L⁻¹)

Table II.12. Germination Rates (GR) and EC₅₀ values for the 2 lettuce cultivars A and B watered with 2 DW samples.

Table II.13. Mean (and standard deviation) values for trace element and nutrients concentration (μ g g⁻¹ of dry mass) in lettuce (*Lactuca sativa* L., cultivars Appia and Batavia dorée de printemps) seeds.

Table II.14a. Metals and majors Appia and Batavia dorée de printemps Co1 watered plantlet concentrations (expressed in μ g g⁻¹ of dry mass).

Table II.14b. Metals and majors Appia and Batavia dorée de printemps Co2 watered plantlet concentrations (expressed in μ g g⁻¹ of dry mass).

Tableau II.15. Synthèse des 4 expérimentations préliminaires concernant l'évaluation de l'écotoxicologie de résidus d'incinération solides via des tests de germination sur *L. sativa* var Regina d'estate.

Tableau II.16. Résultats des comparaisons des ratios des différents traitements du protocole III.

Tableau II.17. Synthèse des résultats des tests préliminaires de germination opérés sur des cendres.

Tableau II.18. Analyse du RITS testé dans cette étude.

Tableau II.19. Résultats de germination des tests réalisés des parties 1 et 2 de l'étude.

Section III – Solutions Synthétiques

Tableau III.1. Gamme de concentrations de cuivre et de nickel, sous différentes formes, en solutions synthétiques, testées lors de bio-essais de *L. sativa* (var B).

Tableau III.2. Gammes de concentrations de 12 ETMs différents, en solutions synthétiques monométalliques, testées lors d'essais écotoxicologiques de *L. sativa* (var B).

Tableau III.3. CE₅₀ de 14 ETMs, testés sous leur forme sulfate, en solutions synthétiques monocontaminées sur *L. sativa* var Batavia dorée de printemps.

Tableau III.4. CE₅₀s de 5 ETMs, testés en solutions synthétiques monocontaminées sur *L. sativa* vars B et GBP.

Table III.5. Toxicities of metallic trace elements (published data) on different organisms (*Lactuca sativa*, *Daphnia magna*, *Pseudoskirkneriella subcapitata* and *Gammarus pulex* or sp.)

Table III.6. Ecotoxicity (EC₅₀ and GR) of different discharge water samples (DW1 to DW5) on *Daphnia magna* and *Lactuca sativa* respectively in relation to Zn and Ni concentrations

Table III.7. EC₅₀ values for daphnia and lettuce for 5 MTE detected in DW samples ICP-AES analysis (Al, Co, Cr, Ni and Zn).

Table III.8. Concentrations of 5 metals (mg L⁻¹) in 4 discharge waters (DW6 to 9) and synthetic solutions (SS6 to 9) in relation to toxicity on *D. magna* and *L. sativa* (EC₅₀ in % of DW or SS)

Tableau III.9. Analyse physico-chimique d'un rejet issu du traitement de surface (Zindel, 16 octobre 2013). L'analyse des HAP s'est focalisée sur les seize molécules organiques ciblées par US EPA, 1976.

Tableau III.10. Propriétés physico-chimiques du tergitol (NP9), du 4-nonylphénol (4NP), du naphthalène (NAP) et du phtalate de dibutyle (DBP).

Tableau III.11. Gammes de concentrations des 4 polluants organiques testés.

Tableau III.12. Gammes de concentrations lors des tests de germination de *L. sativa* var Batavia dorée de printemps.

Tableau III.13. CE₅₀ du NP9, du 4NP, du NAT et du DBP.

Tableau III.14. Résultats test #1.

Tableau III.15. Résultats test #2.

Tableau III.16. Résultats test #3.

Table III.17. Literature reviews on alkylphenol substances (selected papers).

Table III.18. Chemical Abstracts Service (CAS) registry names, numbers and abbreviation for several APs.

Table III.19. Properties of some NPs and OPs.

Table III.20. Principal processes for APs removal proposed in the literature and discussed in this review.

Table III.21. A brief summary of advantages, disadvantages and remarks concerning the main methods for AP removal from water and wastewater.

LISTE DES FIGURES

Section I – Etat de l’art

- Figure I.1. Spectre de tailles des différents composés d’une eau de rejet, comparées aux tailles de différents organismes biologiques.
- Figure I.2. Description générale et synthétique des différentes étapes du TS.
- Figure I.3. Notion de « bon état » général (dépend de l’état chimique et écologique) des eaux de surface définie par la Directive Cadre sur l’Eau.
- Figure I.4. Ecotoxicologie : discipline à l’interface.
- Figure I.5. Rôles principaux de l’écotoxicologie dans l’évaluation des risques environnementaux.
- Figure I.6. Répartition des différentes formes métalliques du plomb Pb en fonction du pH.
- Figure I.7. Comparaison de deux types de pollution à partir d’une même dose polluante.
- Figure I.8. Evolution des peuplements benthiques dans les abers à la suite du naufrage de l’Amoco Cadiz.
- Figure I.9. Anatomie d’une daphnie *Daphnia magna*.
- Figure I.10. Protocole du test d’inhibition de la mobilité.
- Figure I.11. Exemple d’une succession de réactions écotoxiques globales.
- Figure I.12. Courbe dose-réponse générale pour les éléments trace métalliques essentiels, potentiellement toxiques (ETMpt), et les éléments trace métalliques non essentiels (ETMss).
- Figure I.13.a. Absorption du Carbone par des plantes dites « en C3 » et « en C4 ».
- Figure I.13.b. Principales étapes du cycle de Calvin (réduction du carbone).
- Figure I.14. Cycle de développement de la laitue.
- Figure I.15. Effet d’un vieillissement intensif (45°C, 80 % d’humidité relative) sur la capacité germinative de semences de différentes espèces végétales.
- Figure I.16. Inhibition de la *germination de semences* de *L. sativa* exposées à 4 RITS industriels différents.
- Figure I.17. Inhibition de la *croissance de plantules* de *L. sativa* exposées à 4 RITS industriels différents.
- Figure I.18. Exemple d’amélioration qualitative des RITS *après* traitement physico-chimique sur la germination (ici *via* l’adjonction de cyclodextrine dans le rejet).
- Figure I.19. Exemple d’amélioration qualitative des RITS *après* traitement physico-chimique sur la croissance (ici *via* l’adjonction de cyclodextrine dans le rejet).
- Figure I.20. Protocole du test de germination.
- Figure I.21. Courbe dose (concentration) réponse type et CE₅₀.
- Figure I.22. Segments d’une plantule de laitue *L. sativa* (la plantule n’est pas étendue ici, pour les besoins de l’illustration photographique).

Section II – Méthodologie

- Fig. II.1. Lettuce germination rate versus concentration of Co1S1 raw discharge waters for the four lettuce varieties (Batavia B, Kinemontepas K, Appia A and Grosse Blonde Parresseuse GBP).
- Figure II.2. Cd, Fe and Zn logged values (and single linear regression) of Appia and Batavia one week growing plantlets against the DW concentration.

Figure II.3. Différentes tendances d'accumulation et de distribution d'ETMs en fonction de la partie végétale (racine, tige, feuille) de la plante.

Figure II.4. Cendres brutes (a) et broyées (b) disposées dans une boîte de Pétri.

Figure II.5. Recette des cendres utilisées lors de cette étude préliminaire.

Figure II.6. Germination [%] de semences de laitue selon le traitement attribué : T, les témoins, C1 et C2, les conditions 1 et 2 (0,2 et 0,4 g par boîte).

Figure II.7. Germination [%] de semences de laitue selon le traitement subi : T, les témoins, contacts direct et indirect des semences avec les cendres broyées.

Figure II.8. Courbe dose réponse et CE_{50} (152,38 g L⁻¹) des semences en contact direct avec les cendres.

Figure II.9. Germination [%] de semences en contact indirect avec des cendres brutes ou broyées à certaines concentrations.

Figure II.10. Variations du rapport RL/RT selon le traitement subi par les semences : T, les témoins, C1 et C2, les conditions 1 et 2.

Figure II.11. Variations du rapport RL/RT selon le traitement subi par les semences : T, les témoins, direct et indirect le type de contact avec les cendres.

Figure II.12. Variations du rapport RL/RT selon le traitement subi par les semences : T, les témoins, A à I, les concentrations croissantes de cendres (*cf.* Tableau II.15).

Figure II.13. Variations du rapport RL/RT selon le traitement subi par les semences

Figure II.14. Protocole de l'étude préliminaire II.

Figure II.15. Perspectives d'approfondissement de l'étude préliminaire II.

Section III – Solutions Synthétiques

Figure III.1. CE_{50} s croissantes du cuivre et du nickel, respectivement sous forme chlorure, acétate, sulfate, et nitrate, chlorure et sulfate.

Figure III.2. Classement d'ETMs (ETMpt en gris ; ETMss en noir) sous forme sulfate selon leur CE_{50} (haut : Sancey, 2011 ; bas : cette étude).

Figure III.3. Germination (%) of *L. sativa* seeds for the DW5 sample and synthetic solutions S1, S2 and S3. Different letters indicated significant differences (*p-value* <0.01).

Figure III.4. Illustration de la tentative de test de l'alcool C12-15.

Figure III.5. Courbes dose-réponse des gammes de mélange de 4NP et de sulfate de nickel, exprimées en fonction de la concentration de nickel dans la solution (gauche : 50 mg L⁻¹ de 4NP ; droite : 100 mg L⁻¹ de 4NP).

Figure III.6. General molecular structure for alkylphenos abbreviated APs (left) and alkylphenol ethoxylates abbreviated APnEOs (right) where n is the average number of moles of ethylene oxide per mole of nonylphenol and ranges from 1 to 100.

Figure III.7. : Molecular structures of some APs.

Section IV – Discussion Générale

Figure IV.1. Bioaccumulation : cycle court.

LISTE DES ANNEXES

Tableau V.1.a. Références bibliographiques du tableau de synthèse I.7.

Tableau V.1.b. Références bibliographiques du tableau de synthèse I.7.

Tableau V.2. Valeurs des CE_{50} d'ETMs (+ bore et fluorure) selon l'élément et selon le complexe élément plus contre-ion.

Tableau V.3. Equivalence des masses/concentration des cendres déposées par boîte de Petri [$g L^{-1}$].

Figure V.1. Version moderne du tableau périodique des éléments de Mendeleïv (table original 1869). Les cases grisées sont les éléments considérés comme des métaux lourds.

Figure V.2. Elevage type de daphnie *Daphnia magna*, en conditions de laboratoire.

Figure V.3. Liste des 16 HAP classés prioritaires par US EPA (1976) et leur formule.

Figure V.4. Protocole III1 de l'étude préliminaire I, menée à l'ETS de Montréal (Québec, Canada) sur l'évaluation de la toxicité de cendres en concentrations croissantes (T les témoins, puis de A à I).

NOTATIONS

ABREVIATIONS ANGLAISES *fréquemment utilisées*

DW	<i>Discharge Water</i>
DWS	<i>DW Sample</i>
GI	<i>Germination Index</i>
GR	<i>Germination Rate</i>
ICP	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
ICP AES	<i>ICP Atomic Emission Spectroscopy</i>
ICP MS	<i>ICP Mass Spectroscopy</i>
LOEC	<i>Lowest Observed Effect Concentration</i>
NOEC	<i>No observed Effect Concentration</i>
RL	<i>Root Length</i>
TL	<i>Total Length</i>

ABREVIATIONS FRANÇAISES *fréquemment utilisées*

A	<i>Lactuca sativa var Appia</i>
B	<i>L. sativa var Batavia dorée de printemps</i>
CE ₅₀	Concentration d'Effet/Efficace inhibé à 50 %
ETM	Élément Trace Métallique (ETMs au pluriel)
ETM _{pt}	ETM Potentiellement Toxique
ETM _{ss}	ETM <i>stricto sensu</i>
GBP	<i>L. sativa var Grosse Blonde Paresseuse</i>
K	<i>L. sativa var Kinemontepas</i>
RI	Rejet Industriel
RITS	RI issu du TS
TS	Traitement de Surface

ÉTABLISSEMENTS

OECD/OCDE	<i>Organization for Economic Cooperation and Development / Organisation de Coopération et de Développement Economique.</i>
US FDA	<i>US Food and Drugs Administration / Administration américaine des produits alimentaires et médicaux.</i>
US EPA	<i>US Environmental Protection Administration / Administration américaine de protection de l'environnement.</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé.
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations / Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.</i>

UNITES

g	gramme
L	litre
m	mètre
$\mu\text{S cm}^{-1}$	siemens

NOTATIONS

Dans tout le document, les valeurs incertaines (données indisponibles, calcul mathématiquement impossible...) seront notées *n.a.* (*not available*), *n.m.* (non mesuré) ou *n.d.* (non défini).

Les organismes seront cités par leur nom vernaculaire (ex. : laitue), et leur nom scientifique, en italique, (ex. : *Lactuca sativa*). Les variétés seront citées selon leur nom usuel français, précédé selon les cas du terme « *var* » (ex. : laitue *var* Kinemontepas, ou *Lactuca sativa var* Kinemontepas).

Quelques libertés de présentation et de mise en page des articles présentés dans ce manuscrit ont été prises. Les citations sont signifiées entre guillemets « ». Les expressions et termes techniques sont signifiés entre guillemets “ ”.

AVANT-PROPOS

Avant de débiter la présentation, l'analyse et la discussion de ce travail de doctorat, nous souhaiterions préciser les choix rédactionnels du mémoire que vous avez sous les yeux. Malgré la forme de présentation de ce mémoire (dite "sur articles"), il nous a paru nécessaire de développer de façon précise mais synthétique les différents contextes dans lesquels s'inscrivent ces travaux :

- le contexte industriel : réalisé au sein du Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249 usc INRA, de l'Université de Franche-Comté, financé par la Ville de Besançon, ce doctorat est également un partenariat inscrit dans le temps (2007) entre une équipe de recherche universitaire, des agences gouvernementales et des entreprises d'un secteur industriel bien particulier, et localement important, le Traitement de Surface. Cette collaboration avait alors pour objectif principal de réduire les émissions de substances potentiellement dangereuses, comme les éléments métalliques, *via* le développement et la mise en place de procédés de décontamination économiquement et écologiquement viables (thèses de Bertrand Sancey et de Jérémie Charles, respectivement soutenues en juillet 2011 et décembre 2012).
- le contexte de recherche : Si la chimie analytique est essentielle dans ce genre de projet, les impacts de **polluants** sur l'environnement et leur évaluation n'en sont pas moins incontournables. C'est la raison pour laquelle **l'écotoxicologie**, les tests écotoxicologiques en général, et celui utilisant la laitue *Lactuca sativa* (L.) en particulier, prennent une place prédominante dans ce travail.

Afin de faciliter la lecture, et parfois la compréhension, de ce manuscrit, il a semblé intéressant de proposer, d'une part, un glossaire à la fin de ce document (chaque mot y figurant est écrit en caractères gras dans le texte), et d'autre part, de présenter à la fin de chaque section un schéma bilan récapitulatif ainsi que les références bibliographiques citées *dans la section*, facilitant ainsi leur accès au lecteur intéressé.

INTRODUCTION

INTRODUCTION GÉNÉRALE

PARLONS-EN UN PEU...

POLLUTION(S) ANTHROPIQUE(S)

C'est un fait, avéré, acté...l'Homme pollue ses environnements proches et lointains. Il ne s'agit pas d'un jugement, pro-cesti ou anti-cela, mais d'un simple constat. Les activités humaines, qu'elles soient domestiques, agricoles et/ou industrielles, modifient et bouleversent plus ou moins durablement la pédosphère (cycles biogéochimiques), l'atmosphère (combustion de bois, de charbon, de plastiques...), l'hydrosphère (rejet de molécules chimiques, de particules, de « déchets »...) et la biosphère (surpression de chasse, de pêche, introduction d'espèces invasives...), depuis le Néolithique (IX^{ème} au III^{ème} siècle avant JC ; West *et al.*, 1997), l'Antiquité des Grecs et des Romains (Hong *et al.*, 1994), la Révolution Industrielle de la fin du XIX^{ème} siècle (Weiss *et al.*, 1999) jusqu'à aujourd'hui (Kampa & Castanas, 2008). Cependant, la *perception* des effets de ces dégradations sur l'environnement n'a réellement débuté que dans les années 1960 (Ramade, 2007). L'édit de Charles VI roi de France en 1382 interdisant l'émission de fumées nauséabondes et mal odorantes dans la ville de Paris reste anecdotique.

La **pollution** anthropique générale peut être décomposée en deux grandes catégories : la pollution **aigüe** (le rejet de substances polluantes dans un **écosystème** est **accidentel** et/ou imprévisible, comme une marée noire) et la pollution **chronique** (le rejet de substances polluantes est **périodique** ou permanent dans un écosystème ; c'est le cas des émissions urbaines ou les activités agricoles). Du fait de la grande diversité et variabilité de ces activités, les substances rejetées sont de nature et d'origine diverses : organique, minérale (métallique), radioactive, naturelles ou synthétiques, etc. On dénombre ainsi plus de 100000 molécules chimiques produites et/ou utilisées par l'Homme (Depledge & Galloway, 2005), rendant leur identification et quantification d'autant plus difficiles. Ces polluants chimiques émis dans l'environnement se retrouvent inévitablement, plus ou moins rapidement, dans les milieux aquatiques, sous de nombreuses formes : dissouts dans l'eau, **adsorbés** sur des matières en suspensions ou sur les sédiments du milieu, accumulés par les organismes vivants du milieu... (Burton, 1992 ; Xuereb, 2009). Les effets de ces polluants sur l'environnement physico-chimique et biologique se mesurent à court terme (pollution

aigüe : pic des concentrations de polluants, forte mortalité...) mais également à long terme (pollution chronique : accumulation progressive dans les sédiments et le long du réseau trophique...).

PENCHONS-NOUS UN PEU...

LE CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL

Parmi les industries présentes en Franche-Comté, le secteur du Traitement de Surface (TS) est incontournable : la région est la troisième d'importance en France. Cette filière particulière utilise dans ses procédés de fabrication de conséquents volumes d'eau et de produits chimiques aux formulations principalement complexes. D'un point de vue médiatico-environnemental, elle véhicule ainsi toujours une mauvaise image en termes de pollution et d'impacts sur l'environnement (milieu aquatique).

Le *principal* problème environnemental du TS est celui de la forte *charge métallique* des eaux de **rejets** : c'est en effet un véritable cocktail d'Eléments Trace Métalliques ou ETMs, en terme de compositions qualitative (Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Zn...) et quantitative (du μg au mg L^{-1} ; **Tableau 0.1**), reflets de l'activité industrielle spécifique et journalière de l'entreprise. Aux métaux s'ajoutent d'autres composés minéraux (sels, fluorures...), des cyanures (libres ou complexés) et encore diverses substances organiques (solvants, dégraissants, tensio-actifs...). Présentes dans les rejets industriels de TS, toutes ces substances, en particuliers les ETMs, sont connues pour être toxiques pour l'Homme et l'environnement et sont libérées dans le milieu aquatique sous forme **biodisponible**, alors **bioassimilable** par la faune et la flore (Boucheseiche *et al.*, 2002). Accumulées dans les organismes, les ETMs en particulier, elles risquent également de biomagnifier tout le long des réseaux trophiques et devenir un danger réel.

Les réglementations, en termes de rejets (quantités et débits journaliers), sont légions autour de l'activité du TS : régionales, nationales et européennes. Chaque industriel, en tant qu'Installation Classée pour la Protection de l'Environnement ICPE, doit ainsi se soumettre à un strict cahier des charges, spécifique à son activité et définit par le Préfet. Cette autorisation administrative décrit entre autres les valeurs limites des rejets, établies selon la nature du polluant, de l'activité concernée, des caractéristiques du milieu récepteur et de sa sensibilité aux perturbations chimiques. En effet, si, selon les conventions individuelles, certains industriels doivent justifier de la

présence et du bon fonctionnement d'une station de traitement physico-chimique sur son site afin de pouvoir répondre du bon état chimique et biologique de ses eaux usées, et que les systèmes de décontamination mis en place génèrent des eaux respectant la réglementation en vigueur, l'abatement, métallique et/ou organique, de la pollution n'est pas total. Pour le secteur du TS en particulier, la composition chimique métallique n'est pas le seul aspect considéré par la législation, les autres paramètres physico-chimiques le sont également : pH, quantité de matières en suspension (MES), demande chimique en oxygène (DCO), différentes formes de l'azote présentes (surtout les nitrites), et les AOX (composés halogénés organiques adsorbables). La liste de ces paramètres varie en fonction de l'activité principale de l'industriel.

Tableau 0.1. Valeurs limites des émissions des principaux polluants dans l'eau pour la filière TS (arrêtés de 2006, 1998 et 1985 ; d'après Sancey, 2011).

Paramètre	Valeurs limites d'émission (mg L ⁻¹)		
	Arrêté 30/06/06	Arrêté 02/02/98	Arrêté 26/09/85
Ag	0,5		
Al	5	0,5 ^a	5
As	0,1		
Cd	0,2		0,2
CrVI	0,1	0,1 ^a	0,1
CrIII	2		3
Cu	2	0,5 ^a	2
Fe	5		5
Hg	0,05		
Ni	2	0,5 ^a	5
Pb	0,5	0,5 ^a	1
Sn	2	2 ^a	2
Zn	3	2 ^a	5
MES	30	100	30
CN	0,1	0,1 ^a	0,1
F	15	15 ^a	15
NO ₂	20		1
Ntot	50	30 ^a	
P	10		10
DCO	300		150
AOX	5	1	
Hydrocarbures totaux	5	10	5
pH (à 20°C)	6,5 – 9	5,5 – 8,5	
Temperature (°C)	< 30	< 30	

^a limites de concentration appliquées quand le flux journalier du paramètre considéré est supérieur au seuil de 1 g j⁻¹ pour les cyanures, et de 5 g j⁻¹ pour le Pb, Cu, Cr et Ni.

ANALYSONS UN PEU...

LE CONTEXTE SCIENTIFIQUE

L'un des objectifs de la *chimie environnementale* est de déterminer les niveaux de pollution des eaux (rejets industriels, effluents urbains, eaux souterraines, etc), et donc de permettre d'obtenir des renseignements sur la qualité chimique des rejets. Elle ne donne en revanche que peu d'informations concernant sa qualité biologique (Banks & Schultz, 2005 ; Zaltauskaite & Vaisiunaite, 2010). *L'écotoxicologie* complète parfaitement la chimie environnementale en permettant de construire diagnostics d'impacts environnementaux plus précis, via la réalisation de tests biologiques ou **bio-essais**. L'intérêt du couplage de ces deux approches est évident : l'analyse chimique détermine les niveaux de contamination d'un milieu et l'écotoxicologie évalue les conséquences environnementales de ces contaminations à plus ou moins long terme.

Il existe une pléthore de bio-essais, animaux, végétaux ou micro-biologiques, terrestres, aquatiques ou marins, autorisant l'estimation d'effets toxiques de polluants sur un écosystème (Rizzo *et al.*, 2001 ; Pandard *et al.*, 2006). Chaque test possède ainsi ses propres avantages et inconvénients tels que la rapidité de la réponse mesurée, la sensibilité du modèle biologique, la représentativité écologique, des résultats obtenus ou encore le coût de mise en œuvre. Il s'avère donc crucial de choisir soigneusement le test à utiliser afin qu'il fournisse des informations les plus précises représentatives du milieu récepteur. Parmi les bio-essais les plus couramment réalisés actuellement sur des organismes aquatiques, on note le test de reproduction ou d'immobilisation de *Daphnia magna* (*e.g.* Charles *et al.*, 2011, 2012), le test de luminescence sur *Vibrio fischeri* (*e.g.* Parvez *et al.*, 2006), le test de **croissance** de *Pseudokirchneriella subcapitata* (*e.g.* Aruoja *et al.*, 2009) ou encore le test de survie impliquant le poisson zèbre *Danio rerio* (*e.g.* Navel, 2001).

Moins utilisés que les tests à indicateurs biologiques animaux, les tests de **phytotoxicité** sont néanmoins très prisés dans le domaine agronome : phytoremédiation (Raskin *et al.*, 1994), recyclage d'eaux usées (domestiques ou industrielles) en eaux d'irrigation (Naaz & Pandey, 2009), ou encore utilisation de boues de station comme amendement (Renoux *et al.*, 2001). La laitue, *Lactuca sativa* (L.), fait partie des bio-indicateurs préconisés, car relativement sensible aux polluants, notamment les polluants métalliques (Di Salvatore *et al.*, 2008), par plusieurs agences nationales et internationales : l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (US

FDA), l'Agence américaine de protection de l'environnement (US EPA), l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), et encore l'Association Française de Normalisation (AFNOR). Malgré ces recommandations, le test laitue reste principalement utilisé dans le domaine de l'écotoxicologie des sols.

Ces dernières années, notre équipe a proposé d'utiliser ce bio-indicateur végétal comme outil écotoxicologique pour estimer non seulement l'impact de rejets industriels de traitement de surface RITS mais également l'efficacité de procédés innovants de traitement des eaux (Sancey, 2011 ; Charles *et al.*, 2011). Les résultats ont démontré que les tests normalisés de **germination** et de croissance de **semences** de *L. sativa* sont des outils appropriés pour évaluer et comparer la **toxicité** de rejets industriels polycontaminés. Ce test écotoxicologique normalisé, est relativement simple, rapide, reproductible et peu onéreux. Les résultats permettent également de corrélérer les concentrations en certaines substances chimiques présentes dans les rejets avec l'impact de ces rejets. Le présent travail de thèse s'inscrit dans la continuité de ces études.

Si les protocoles des tests écotoxicologiques impliquant *L. sativa* sont standardisés, la littérature traduit une réalité expérimentale toute différente. En effet, d'un article à l'autre, de nombreux paramètres varient, du nombre de semences par contenant, à la nature du contenant, du volume de rejet ou de solution synthétique testé, à la durée du test, ou encore de la variété de laitue utilisée. Dans ce travail de thèse, la démarche mise en place est :

- d'une part d'étudier la variabilité des réponses écotoxicologiques par une double approche méthodologique et physiologique, et,
- d'autre part de documenter l'impact de polluants métalliques présents dans des rejets industriels ou dans des solutions synthétiques, seuls ou en mélange, et de les classer selon leur phytotoxicité.

Les objectifs sont ainsi :

- la réévaluation du protocole de germination, et en particulier les différents paramètres du test comme le choix du matériel biologique d'un point de vue variétal, et,
- l'estimation et le classement de la toxicité des principaux métaux présents dans les rejets de la filière TS et dans des mélanges métalliques reconstitués en laboratoire.

Afin de présenter ces études, le mémoire s'articule en trois sections : la première est une synthèse bibliographique, la deuxième et la troisième exposent les différentes

démarches expérimentales mise en place. Chaque section est en fait la contextualisation d'articles scientifiques paru, accepté, soumis ou en cours d'écriture.

La section bibliographique est un large état de l'art du sujet, documentant sur les RITS, des effets toxicologiques connus des ETMs, et de l'utilisation de la laitue comme bio-indicateur végétal dans le cadre d'un test écotoxicologique normalisé. La seconde section présente l'étude de la variabilité des réponses écotoxicologiques des semences de laitues en contact avec des rejets industriels issus de différentes filières de traitement de surface, ainsi que d'accumulation d'éléments métalliques au sein des **plantules** de laitues. La dernière section montre les résultats d'expériences menées avec des solutions synthétiques mono- et poly-contaminées, avec des rejets industriels et des mimes synthétiques. Cette dernière pratique est particulièrement utilisée afin de définir l'identité (nature et concentration) des principaux composés chimiques responsables de l'impact écotoxicologique d'un rejet.

A l'issue de ces sections de résultats et discussions, un bilan des travaux est dressé au travers d'une discussion générale, finalisée par la présentation des perspectives envisageables à la suite de cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A.** 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ*, 407: 1461-1468.
- Banks MK, Schultz KE.** 2005. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soil. *Water Air Soil Poll*, 167:211-219.
- Boucheseiche C, Cremille E, Pelte P, Pojer K.** 2002. Guide technique "Quand les toxiques se jettent à l'eau". Agence de l'Eau Artois Picardie avec la collaboration de la DRIRE Nord-Pas de Calais, de la DRIRE Picardie et de l'association ACORE. 122 p.
- Burton GA.** 1992. Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, London, 211p.
- Depledge MH, Aagaard A, Györkös P.** 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Mar Pollut Bull*, 31:19-27.
- Di Salvatore M, Carafa AM, Carratù G.** 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73:1461-1646.
- Hong S, Candelone JP, Patterson CC, Boutron CF.** 1994. Greenland ice evidence of hemispheric lead pollution two millennia ago by Greek and Roman civilizations. *Science*, 265:1841-1843.
- Kampa M, Castanas E.** 2008. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut*, 151:362-367.
- Naaz S, Pandey SN.** 2009. Growth and biochemical responses of tomato irrigated with industrial effluent. *Res Environ Life Sci*, 2:91-94.
- Nagel R.** 2001. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, 19:38-48.
- Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Féraud JF, Grand C, Bispo A.** 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci Total Environ*, 363:114-125.
- Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S.** 2006. A review on advantages of implementing inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ Int*, 32:265-268.
- Raskin I, Kumar PBA, Dushenkov S, Salt DE.** 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr Opin Biotech*, 5:285-290.
- Ramade F.** 2007. Introduction à l'écotoxicologie : Fondements et applications. Editions Lavoisier, Paris, 518p.
- Renoux AY, Tyagi RD, Samson R.** 2001. Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. *Water Res*, 35:1415-1424.
- Rizzo L.** 2001. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res*, 45:4311-4340.
- Weiss D, Shotyk W, Appleby PG, Kramers JD, Cheburkin AK.** 1999. Atmospheric Pb deposition since the industrial revolution recorded by five Swiss peat profiles: enrichment factors, fluxes, isotopic composition, and sources. *Environ Sci Technol*, 33:1340-1352.
- West S, Charman DJ, Grattan JP, Cherbukin AK.** 1997. Heavy metals in Holocene peats from South West England: Detecting mining impacts and atmospheric pollution. *Water Air Soil Poll*, 100:343-353.

Xuereb B. 2009. Développement des marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Thèse de Doctorat ès Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz.

Žaltauskaitė J, Vaisiūnaitė R. 2010. Evaluation of municipal effluent toxicity using higher plants and invertebrates. Environ Res Eng Manage, 53:17-23.

I. ÉTAT DE L'ART

Introduction	31
1 Rejets.....	31
1.1 Rejets Industriels en général.....	31
1.2 Le Traitement de Surface (TS) en particulier	34
1.3 Cadre juridique et réglementation	36
2 Écotoxicologie.....	41
2.1 Toxico ? Écotoxico ?.....	41
2.1.1 DéfinitionS.....	41
2.1.2 Petit historique.....	43
2.2 Bio-essais.....	44
2.2.1 Paramètres	45
2.2.1.1 Exposition	45
2.2.1.2 Organismes vivants.....	47
2.2.2 Mesures d'écotoxicité.....	50
2.2.2.1 Doses : létales, d'effet ou d'inhibition	50
2.2.2.2 Concentrations : létales, d'effet ou d'inhibition	51
2.2.2.3 Seuils de toxicité.....	51
2.2.3 Bilan	52
2.3 Polluants.....	53
2.3.1 Généralités.....	53
2.3.2 Ecotoxicité de polluants chimiques : <i>Focus</i> sur les métaux	55
2.3.2.1 Métaux lourds ou ETMs ?.....	55
2.3.2.2 ETMpt : Effets bénéfiques	57
2.3.2.3 ETMpt et ETMss : Effets délétères.....	57
3 <i>Lactuca sativa</i> (L.)	61
3.1 Généralités	61
3.1.1 Historique	61

3.1.2	Classification, systématique et commercialisation.....	62
3.2	Caractéristiques biologiques et physiologiques	63
3.3	Bio-indicateur écotoxicologique	66
3.3.1	Protocole du test	68
3.3.2	Taux de germination GR	68
3.3.3	Courbe dose-réponse et CE_{50}	69
3.3.4	Élongations Racinaire RL et Totale TL.....	69
3.3.5	Indice de Germination GI.....	70
	Bilan de la Section 1.....	71
	Bibliographie.....	72
	Articles, Ouvrages	72
	Webographie.....	79

INTRODUCTION

« Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme »¹.

Tout processus, toute activité génère des produits et des rejets. Ce constat s'applique dans le cas de réactions physiques, chimiques, physiologiques : c'est ainsi que la photosynthèse, par exemple, permet la *production* de matière organique sous forme de glucose à partir de dioxyde de carbone et d'eau et *rejette* du dioxygène. Mais aussi pour les activités anthropiques : ainsi, chaque activité domestique, agricole ou industrielle génère des produits définis comme "déchets" s'ils ne sont pas *a priori* exploitables. Les rejets industriels RI, par exemple, ont des conséquences, plus ou moins importantes selon la nature du/des rejets, sur l'environnement de l'Homme, proche ou lointain, et à plus ou moins long terme. La généralisation et la mondialisation de ces pollutions rendent essentielles les évaluations et diagnostics environnementaux, *via* des tests écotoxicologiques, *in vitro* ou *in situ*, sur des bio-indicateurs.

Cette première section a pour but de faire un point bibliographique des différents thèmes abordés par la suite. Tout d'abord, les caractéristiques des RI en général et RITS en particulier seront définies. La composition de rejets types du TS, ses problématiques environnementales, notamment sa charge en ETMs, et législatives seront présentées. Quelques données de base d'écotoxicologie permettront d'expliquer l'importance des tests écotoxicologiques pour compléter les analyses chimiques des rejets ainsi qu'une synthèse des effets connus des ETMs sur les végétaux. La dernière partie sera enfin consacrée à l'indicateur biologique utilisé lors de ce doctorat : la laitue *Lactuca sativa* L.

¹ Maxime d'Anaxagore (500-428 av. JC) « Rien ne naît, ni ne périt, mais des choses déjà existantes se combinent, puis se séparent de nouveau », reformulée en 1789 par Antoine Lavoisier (1743-1794).

1 REJETS

1.1 Rejets Industriels en général

Il faut tout d'abord distinguer deux termes très souvent assimilés : **effluent** et **rejet**. En effet, si un effluent (ou une eau) industriel *peut* être traité, un **rejet** industriel *est* une eau traitée, bientôt déversée dans le milieu aquatique naturel ou envoyée en station d'épuration : en clair, un rejet est un effluent, un effluent n'est pas un rejet.

Les rejets sont aussi divers que les secteurs industriels ([Tableau I.1](#)) : fonderie, sidérurgie, traitement de surface... Les RI varient même au sein d'un seul métier. Les composés présents dans les eaux à traiter peuvent être classés en 4 grandes catégories (Sigg *et al.*, 2014 ; [Figure I.1](#)) :

- 1) Les matières en suspension (MES), ont une taille supérieure à 100 μm . Minérales, organiques et/ou biologiques, les MES sont l'ensemble des matières solides non dissoutes visibles à l'œil nu. La quantité de MES dans une eau, dans un rejet... définit sa **turbidité**. Un excès de MES dans un milieu aquatique naturel (lagune, cours d'eau, estuaire *etc*) peut avoir deux types d'effets néfastes : physique dans un premier temps, par formation d'un écran bloquant la pénétration de la lumière (diminution de la photosynthèse et conséquences le long de la chaîne alimentaire, jusqu'à atteindre l'**eutrophisation** du milieu), ou encore en colmatant les branchies des poissons (Brosse *et al.*, 2011) ; chimique dans un second temps, la sédimentation des MES générant une réserve potentielle de pollutions/polluants ;
- 2) Les matières colloïdales (MC) et/ou supracolloïdales (MsC), sont des MES (leur taille est d'environ 1 μm ; on parle de particules supracolloïdales quand leur taille est comprise entre 1 et 100 μm) : elles peuvent être retenues par filtration ou centrifugation. Plus fines que les MES *stricto sensu*, elles opposent également une grande stabilité physique (forces de répulsion, de van der Waals *etc...*) qui leur confère une décantation très lente voire impossible sous le seul effet de la gravité. La quantité de MC influence le caractère plus ou moins turbide de l'eau, mais également sa couleur ;
- 3) Les matières dissoutes (MD), ou solubles, sont par définition invisibles, et généralement composées, pour les RI, de matière organique¹, de colorants, d'ETMs et de composés azotés et organo-phosphorés. On peut distinguer deux fractions des MD : biodégradables et non-biodégradables. La charge métallique

¹ La charge organique d'un échantillon est "estimée" par la mesure de la **DCO** (Demande Chimique en Oxygène) ou de la mesure plus récente du **COT** (Carbone Organique Total)

d'un effluent ou d'un rejet pose ainsi de sérieux problèmes environnementaux car non-biodégradable. Les charges azotées et phosphorées n'en sont pas en reste puisque leur excès participe au(x) processus d'eutrophisation d'un système (Audoin, 1991) ;

- 4) Les matières non miscibles (MnM), ou immiscibles, ne se mélangent pas à la fraction aqueuse de l'eau : les huiles (huiles de coupes, hydrocarbures, dégraissants...) se dissolvent en effet très peu et se lient aux différents additifs de fabrication (phénols amines aromatiques...).

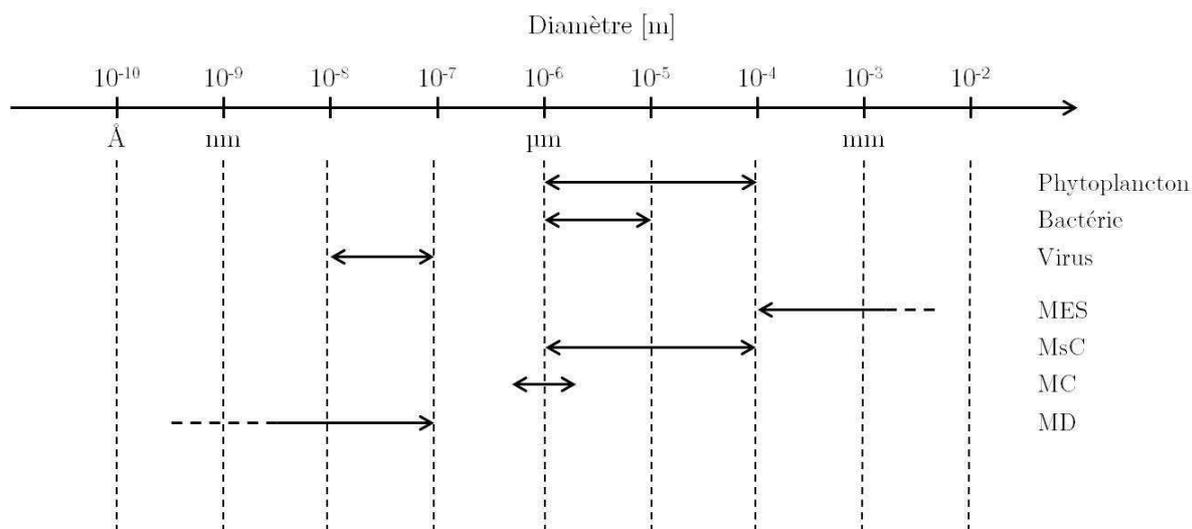


Figure I.1. Spectre de tailles des différents composés d'une eau de rejet, comparées aux tailles de différents organismes biologiques (adapté de Sigg *et al.*, 2014).

Tableau I.1. Exemples de listes de Substances Dangereuses SD potentiellement présentes dans les rejets aqueux de différents secteurs industriels. L'accent est mis sur les SD métalliques, présentées en couleur (en gras les SD communément retrouvées dans les rejets ; en italique les SD dont la présence a été constatée)(Source : circulaire 5 janvier 2009).

Travail mécanique des métaux	Fonderies de métaux ferreux	Fonderies de métaux non ferreux
Nonylphénols	Nonylphénols	Nonylphénols
Cadmium, Chrome, Cuivre **	Cadmium **	Cadmium, Chrome, Cuivre **
Fluoranthène	Fluoranthène	Fluoranthène
Mercure **	Naphtalène	Mercure **
Naphtalène	Nickel, Plomb **	Naphtalène
Nickel, Plomb **		Nickel, Plomb **
Tri- et tétra-chloroéthylène		Trichloroéthylène
Zinc **		Zinc **
Chloroforme		
<i>Octylphénols</i>	<i>Anthracène</i>	<i>Anthracène</i>
<i>Anthracène</i>	<i>Arsenic **</i>	<i>Octylphénols</i>
<i>Arsenic **</i>	<i>Chloroforme</i>	<i>Pentachlorophénol</i>
<i>Dichlorométhane</i>	<i>Chrome, Cuivre, Mercure **</i>	<i>Toluène</i>
<i>BDE*</i>	<i>Pentachlorophénol</i>	<i>Tributylphosphate</i>
<i>Tétrachlorure de carbone</i>	<i>Tri- et tétra-chloroéthylène</i>	<i>Xylènes</i>
<i>Toluène</i>		
<i>Mono-, Di-, Tri-butylétain</i>		
Production ^{et/ou} transformation de métaux non ferreux	Sidérurgie	Traitement de Surface
Nonylphénols	Nonylphénols	Nonylphénols
Anthracène	Anthracène	Cadmium **
Cadmium, Cuivre **	Arsenic, Cadmium, Chrome, Cuivre **	Chloroforme
Fluoranthène	Cuivre **	Chrome, Cuivre **
Mercure **	Fluoranthène	Fluoranthène
Naphtalène	Naphtalène	Mercure **
Nickel, Plomb **	Nickel **	Naphtalène
Tri- et tétra-chloroéthylène	BDE*	Nickel, Plomb, Zinc **
Zinc **	Plomb, Zinc **	Tri- et tétra-chloroéthylène
<i>Octylphénols</i>	<i>Benzène</i>	<i>Anthracène</i>
<i>Arsenic **</i>	<i>Chloroforme</i>	<i>Arsenic **</i>
<i>Chloroforme</i>	<i>Mercure **</i>	<i>Dichlorométhane</i>
<i>Chrome **</i>	<i>Tributylphosphate</i>	<i>Héxachlorobenzène</i>
<i>BDE*</i>		<i>Octylphénols</i>
		<i>BDE*</i>
		<i>Toluène</i>
		<i>Mono-, di-, tri-butylétain cation</i>
		<i>Tétrachlorure de carbone.</i>

* diphényléther polybromés

** et ses/leurs composés

1.2 Le Traitement de Surface (TS) en particulier

Qui à notre époque n'a l'utilité d'aucun de ces objets, ou pièces de ces objets : téléphone intelligent, ordinateur, montre, bijou, pacemaker, axe de pédale de vélo, pare-chocs, lampadaire... ? Tous ces objets, aussi différents soient-ils, ont un point en commun : tout ou partie des pièces qui les composent a été traité par TS. Activité millénaire, le TS débute avec l'utilisation de l'or pour décorer des objets (4500 av JC, Nécropole de Varna et ses bijoux en or les plus vieux connus à ce jour ; Renfrew, 1986). Dorure et argenture étaient connues au XIII^e siècle, ainsi que le dépôt de l'étain et du cuivre sur le fer (Bohème ; Gowland, 1899). Aujourd'hui, au XXI^e siècle, ce secteur industriel est important à différents niveaux :

- **européen** : ~18000 installations dans l'UE-15 (BREF, 2006) ;
- **français** : plus de 300 entreprises, plus de 20000 salariés et 2,35 milliards d'euros de chiffre d'affaire (SESSI, 2007) ;
- **régional** : la Franche-Comté est la troisième région française de TS en termes d'emplois et d'activité.

En quoi consiste plus précisément le traitement d'une pièce métallique ([Figure I.2](#)) ? Le TS est la suite des procédés qui permettent le dépôt, sur une pièce brute, d'une fine couche d'un autre métal choisi pour ses **propriétés physiques spécifiques** (résistance à la corrosion, amélioration de la dureté, résistance à l'usure, isolation ou conductivité électrique, pouvoir de réflexion, aspect décoratif... ; BREF, 2006) comme l'or, le cuivre, le chrome ou le plomb, sans pour autant modifier ou altérer les **propriétés intrinsèques** de la pièce traitée (Lévêque, 2007). Le TS est en grande partie un service sous-traité, utilisé par de nombreux autres secteurs industriels comme l'automobile (22 %), la construction (9 %), l'industrie électronique (7 %)... (CRAMIF, 2010).

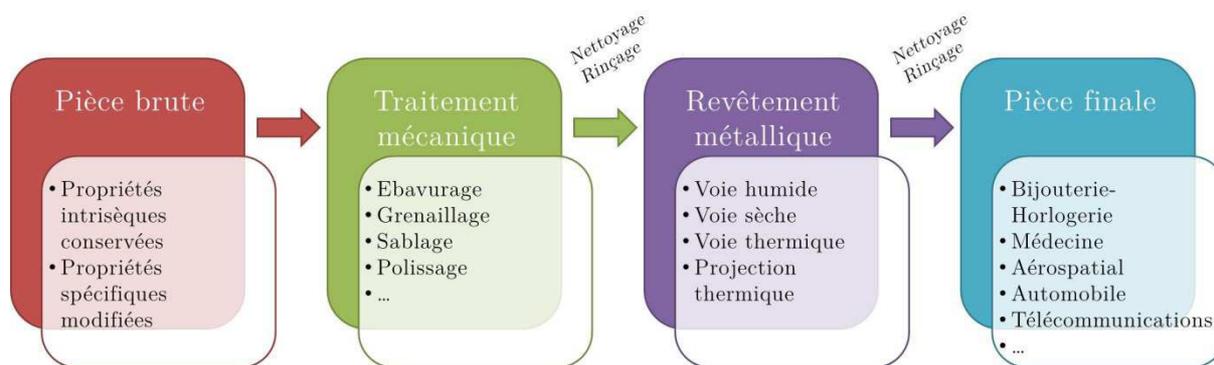


Figure I.2. Description générale et synthétique des différentes étapes du TS.

Comme toute activité humaine, le TS est une activité polluante. Les rejets issus du TS sont de trois types différents (Charles, 2012) :

- **liquides**, résultats du traitement¹ des effluents et relargués dans le milieu naturel ou dans le réseau d'égouts ;
- **solides**, principalement des résidus de matières premières liés à l'activité (boues d'hydroxydes métalliques, dépôts...) ou des consommables (filtres colmatés...). Ils sont traités par des structures extérieures (enfouissement, incinération, recyclage...) ;
- **gazeux**, émissions de vapeurs et gaz lors des réactions chimiques le long de la chaîne (bains de traitement) ou dans les cuves de stockage des effluents.

Les principaux problèmes environnementaux de cette filière résident en ses importantes **consommations d'eau** (les eaux usées et rejets du TS sont en effet considérés parmi les plus polluants ; Babula, 2008) et de **réactifs chimiques** et de **métaux**. Ce sont en fait de véritables cocktails de polluants (Tableau I.2), très difficiles à traiter, puisqu'on y trouve des molécules organiques (chloroforme, trichloroéthylène...), minérales (sels, fluorures, bore...) et métalliques (Zn, Cu, Ni, Fe, Cr, Al, Sn, Cd...).

¹ Les effluents bruts d'une usine de TS doivent être traités avant sortie (ils deviennent alors des rejets ; cf. 1.1 Rejets Industriels). La station de décontamination de ces eaux peut également générer des rejets (liquides, solides et/ou gazeux).

Tableau I.2. Nature des principales substances chimiques présentes dans les différents types d'effluents selon l'opération de traitement (Source : Sancey, 2011).

Opération	Nettoyage	Prétraitement	Traitement	Passivation *
Contaminants chimiques	Cyanures,	Métaux,	CrVI,	CrVI,
	MES,	Fluorures,	Métaux,	Métaux,
	DCO,	Phosphore,	Cyanures,	Cyanures,
	Métaux,	MES,	DCO	Phosphore
	Hydrocarbures,	CrVI,	Fluorures,	
	Huiles,	DCO	Phosphore	
	Phosphore			
Contaminants physiques	pH (↗)	pH (↘)	pH (↘ et ↗)	pH (↘)

*opération agissant sur la modification physico-chimique de la couche superficielle de la pièce

1.3 Cadre juridique et réglementation

Qu'il s'agisse du Sommet de la Terre de Rio de Janeiro¹ en 1992, du protocole de Kyoto (1997), du Grenelle de l'Environnement en France (2007) ou plus récemment, du Sommet de Rio + 20 (2012), le monde politique, économique et social prend peu à peu conscience que d'importants efforts en matière d'environnement sont à entreprendre (alternatives énergétiques, diminution et traitement des déchets, restructuration des politiques agricoles et halieutiques...) afin de ne pas choisir entre croissance économique et protection de la planète mais de lier les deux. L'union Européenne et la France œuvrent pour atteindre un « bon état chimique et écologique de toutes les masses d'eau aux horizons 2015-2018 » (Figure I.3). La lutte contre la pollution de l'environnement aquatique par des substances toxiques (métaux, organiques...) est un réel enjeu environnemental, sanitaire et économique.

¹ Bien qu'il s'agisse du plus connu, le Sommet de la Terre de Rio de Janeiro est en fait la troisième réunion organisée par l'ONU. Les deux premiers eurent lieu à Stockholm en 1972 et à Nairobi en 1982.

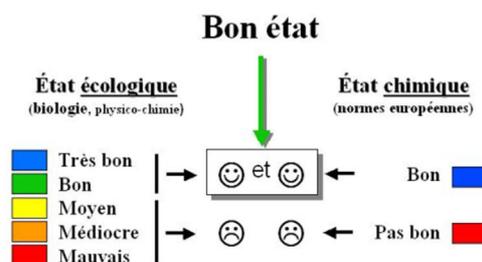


Figure I.3. Notion de « bon état » général (dépend de l'état chimique et écologique) des eaux de surface définie par la Directive Cadre sur l'Eau (Directive EC, 2000) (Source : eaufrance.fr).

De nouvelles politiques strictes sur l'eau, européennes et nationales, ont été ainsi réfléchies, définies et mises en place :

- la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/EC (DCE ; Directive EC, 2000), établissant un « cadre juridique pour une politique communautaire dans le domaine [la protection] de l'eau [intérieure de surface, souterraine, de transition et côtière] » ;
- la directive 2006/11/EC (Directive EC, 2006), concernant et encadrant « la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté » ;
- le programme REACH (Répertoire, Evaluer, Autoriser les substances Chimiques ; Regulation EC, 2006), obligeant « des producteurs et utilisateurs professionnels de substances chimiques à évaluer et gérer les risques d'utilisation » ;
- la campagne RSDE (Recherche et réduction des Substances Dangereuses dans l'eau ; Circulaire, 2002), transposant la DCE en droit français.

Organisée entre 2002 et 2006, la première campagne RSDE dans le secteur du TS a permis d'établir, sur 106 substances recherchées :

- la présence de 99 % des substances au moins une fois dans les rejets industriels ;
- la présence de 69 % des substances au moins une fois dans les rejets de stations d'épuration ;
- la présence de 6 substances dans plus de 50 % des rejets (Cu, Zn, Cr, Ni, Pb et chloroforme).

Une liste de substances dangereuses prioritaires (SDP), prioritaires (SP) ou d'intérêt (ni SDP ou SP) a ainsi été constituée ([Tableau I.3](#)). Cinquante substances y sont présentes : 41 caractéristiques du bon état chimique des eaux, et 9 caractéristiques du bon état écologique, avec des objectifs nationaux de diminution et/ou de suppression. L'identification et la quantification fiables des flux rejetés dans le milieu

sont indispensables à la politique de réduction/suppression d'émission industrielle de polluants menée par l'Union Européenne et le gouvernement français, via les Agences de l'eau. Ces agences incitent les industriels à diminuer leurs émissions en 1/ les soumettant à une redevance (proportionnelle aux quantités annuelles de polluants émis dans l'environnement, et donc spécifique à l'activité industrielle), et 2/ en aidant ces mêmes industriels, mais aussi les agriculteurs et les collectivités locales à investir dans ces travaux de réduction/suppression de polluants.

Arrêté du 25/01/10 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface				
	Substances (41) caractéristiques du bon état chimique des eaux			Polluants (9) caractéristiques du bon état écologique des eaux
	Substances Dangereuses Prioritaires de la DCE (SDP)	Substances Prioritaires de la DCE (SP)	Substances « Liste I » de la directive 2006/11, non incluses dans la DCE	Substances « Liste II » de la directive 2006/11, non incluses dans la DCE
Objectifs de réduction nationaux pour 2015¹	50 % du flux des rejets	30 % du flux des rejets	50 % du flux des rejets	10 % du flux des rejets (pour substances soulignées)
Objectifs DCE sur les rejets	Suppression des rejets (nov 2021 ou dec 2028)	Réduction des rejets (pas délai)	Pas d'objectifs	Pas d'objectifs
Substances ou familles de substances concernées	Composés du tributylétain (TBT) Pentabromodiphéyléther (PBDE) Nonylphénols Chloroalcanes C10-C13 5 HAP Antracène Pentachlorobenzène Mercure et ses composés Cadmium et ses composés Hexachlorobenzène Hexachlorocyclohexane Hexachlorobutadiène Endosulfan	DEHP, DCM et TCB Octylphénols Diuron Nickel et ses composés Plomb et ses composés Fluoranthène Chloroforme Atrazine Chlorpyrifos Naphthalène Alachlore Isoproturon Chlorfenvinphos Pentachlorophénol Benzène Simazine 1,2 dichloroéthane Trifluraline	Tri- chloroéthylène Tétra- chloroéthylène Aldrine Tétrachlorure de carbone Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) Dieldrine Isodrine Endrine	Arsenic Chrome Cuivre Zinc Chlortoluron Oxadiazon Linuron 2,4 D 2,4 MCPA

Tableau I.3. Liste des substances prises en compte dans la caractérisation de l'état des eaux (Source : Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée & Corse, 2010).

¹ Circulaire du 7 mai 2007, qui définit les objectifs de réduction nationaux pour les émissions de l'ensemble de ces substances (toutes sources confondues ; année de référence : 2004).

En plus de ces analyses chimiques, certains industriels du TS doivent s'intéresser de près à la qualité environnementale de leurs rejets, en particulier si ces rejets sont déversés directement dans le milieu naturel. L'impact environnemental de ces rejets est évalué avec des tests écotoxicologiques : le "test daphnies" est parmi les plus utilisés.

2 ÉCOTOXICOLOGIE

2.1 *Toxico ? Écotoxico ?*

2.1.1 DéfinitionS

Etymologiquement parlant, la définition de l'**écotoxicologie** est relativement simple :

- *eco*, du grec *oikos*, la demeure, la maison... écologiquement parlant, le **biotope** ;
- *toxico*, du grec *toxico* (ou du latin pas moins original, *toxicus*), le poison ; et
- *logie*, du grec *logos*, le discours, la science.

En somme, l'écotoxicologie serait « la science qui étudie les polluants (poisons), et ses effets sur l'environnement ». C'est sans compter sur l'aspect transdisciplinaire de l'écotoxicologie, à la frontière entre la **toxicologie** et l'**écologie** (Figure I.4), qui complique les choses. Tout dépend de fait à quelle définition on se réfère :

- un toxicologue comme Truhaut (1977), Hayes (1991) ou encore Klaassen et Eaton (1991) envisagera l'écotoxicologie comme une branche de la toxicologie ;
- Moriarty (1983) en revanche, ne conçoit pas le problème de cette façon : pour cet écologue, l'écotoxicologie dérive de l'écologie.

Ces ergotages autour de la définition de l'écotoxicologie peuvent faire sourire et être assimilés à des tempêtes dans des verres d'eau d'ultra-spécialistes, mais cela va au-delà de ces considérations scientifico-scientifiques. En effet, Forbes et Forbes (1997) font mention d'une distinction de la Commission des Communautés Européennes, dans le cadre de la directive 67/548/EEC (Directive EC, 1967) encadrant la mise sur le marché de nouveaux produits chimiques (classification, emballage et étiquetage), entre d'une part les essais réalisés sur mammifères (essais "toxicologiques") et les essais sur poissons et crustacés d'autre part (essais "écotoxicologiques"). Si on peine encore à définir l'écotoxicologie, on peut éventuellement répondre à la question suivante : *qu'est-ce que la toxicologie ?*

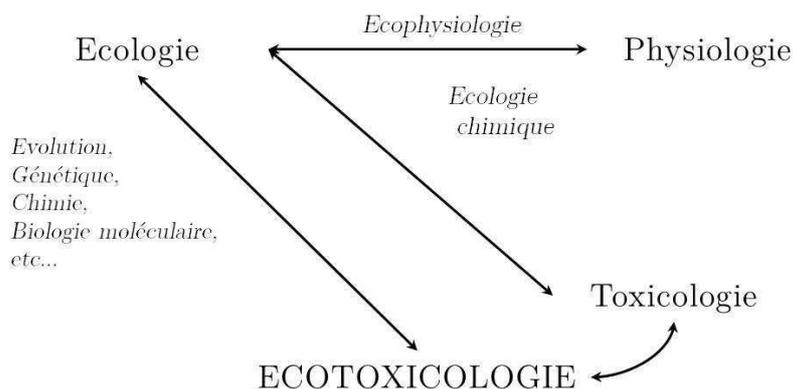


Figure I.4. Ecotoxicologie : discipline à l'interface.

Pour certains (Klaassen & Eaton, 1991), il s'agit de l'étude des effets négatifs de produits chimiques (naturels ou synthétiques) sur les êtres vivants, sans distinction. La même année, Gallo et Doull restreignaient cette discipline aux effets délétères des **xénobiotiques**. Si Sipes et Gandolfi (1986) considéraient les xénobiotiques comme tout produit chimique étranger à l'Homme ou toute autre espèce vivante (animale, végétale, microbiologique), incluant donc les produits naturels et de synthèse, Rand et Petrocelli (1985) réduisaient le spectre des produits xénobiotiques aux seules substances non naturelles. Aujourd'hui, la toxicologie est plutôt considérée comme l'étude des expositions *humaines* aux polluants et toxines (sources atmosphériques, aquatiques, alimentaires...), de leurs mécanismes d'action, de leurs effets délétères sur la santé *humaine*, des moyens mis en œuvre pour les détecter et lutter contre ces effets.

Les conceptions et définitions de l'écotoxicologie proposées par Truhaut et Ramade, chacun en 1977, auraient tendance à se calquer sur cette définition de la toxicologie, en élargissant simplement le sujet d'étude à l'ensemble des êtres vivants d'un écosystème, quelle que soit sa taille. Mais là encore, ce n'est pas si simple. Si Moriarty (1983) et Butler (1984) s'accordent à définir l'écotoxicologie comme l'étude des effets des polluants sur les biotopes et les **biocénoses** d'un milieu, en 1991, Hayes oppose la *toxicologie environnementale*, qui se focalise sur les effets toxiques subis par les êtres vivants différents de l'Homme et des animaux domestiques, à la *toxicologie écologique*, qui étudie les effets des produits toxiques sur les organismes vivants et les relations écologiques générées par ces poisons. La même année, Klaassen et Eaton précisent cette opposition en définissant l'écotoxicologie comme une branche de la toxicologie environnementale, spécialisée sur l'étude des impacts des substances toxiques sur la dynamique des populations d'un écosystème particulier. On peut alors parler d'écotoxicologie ou de toxicologie aquatique, terrestre... Cette absence de vraie

définition fixe pour l'une et pour l'autre de ces disciplines pose des problèmes de confusion comme mentionné plus haut (Forbes & Forbes, 1997), mais aussi des amalgames, en particulier pour les non-spécialistes parmi lesquels les partenaires politiques, sociaux et financiers de ces questions environnementales, puisqu'il est bien question d'environnement ! Dans ce manuscrit, l'écotoxicologie sera considérée comme « *l'étude des effets négatifs (symptômes, mécanismes d'action...) de produits polluants, naturels ou synthétiques, sur l'ensemble des êtres vivants d'un écosystème donné* ». Cette science a trois buts principaux (Ramade, 1989 ; Amiard, 1990 ; **Figure I.5**) :

- définir l'**écotoxicité** d'un polluant (seuils de toxicité, d'innocuité...) ;
- définir la probabilité d'exposition à polluant (selon les propriétés physicochimiques du produit, la durée d'exposition, le mode d'exposition...) ;
- développer des méthodes d'évaluation pour détecter, anticiper et contrôler ces effets sur l'environnement et ses occupants (animaux, végétaux et microbiologiques).

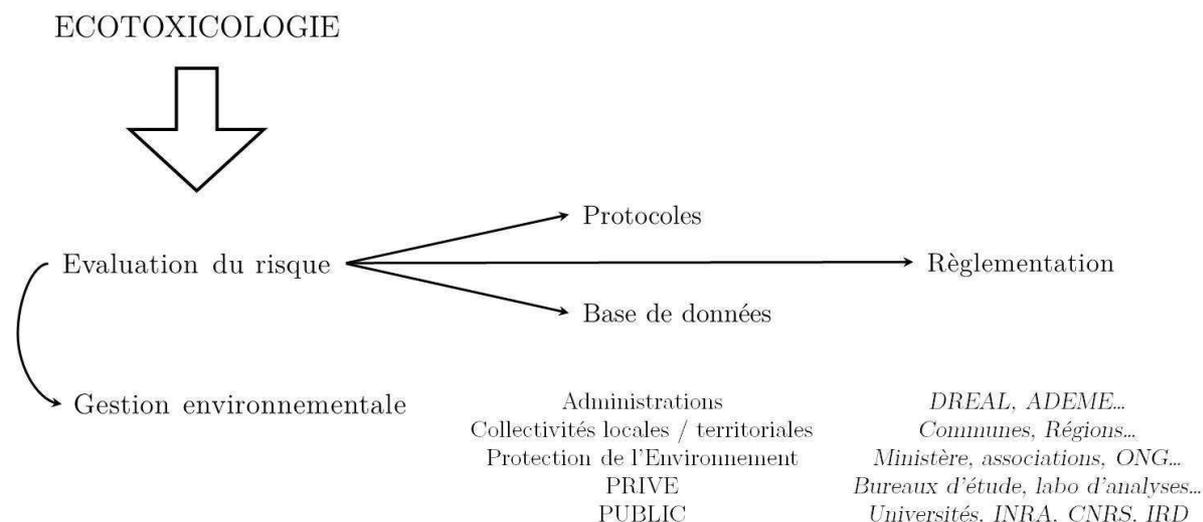


Figure I.5. Rôles principaux de l'écotoxicologie dans l'évaluation des risques environnementaux.

2.1.2 Petit historique

Les premières études écotoxicologiques datent de la fin de la Seconde Guerre Mondiale. Parmi elles, on peut relever :

- la maladie Itai-Itai (Toyoma, Japon) ; initialement observée en 1912, elle fut dans un premier temps associée à des problèmes de malnutrition de la population. Cette maladie (itai-itai en japonais peut être traduit par aïe-aïe) est en fait due à la trop grande quantité de cadmium relarguée par l'industrie

minière locale dans l'environnement (eaux de rivières) et accumulée (poissons et irrigation des rizières). Elle fût reconnue en 1968 comme la première maladie provoquée par des pollutions environnementales.¹

- la maladie de Minamata (Minamata, Japon) ; est la conséquence du déversement de dérivés méthylés de mercure dans la baie de Minamata, et de leur accumulation dans les eaux, les sédiments, les poissons, *etc...* Elle provoque chez l'Homme d'importants dysfonctionnements rénaux et de malformations chez les nouveaux-nés.²
- le déclin dramatique des populations d'oiseaux piscivores et d'oiseaux de proie (Europe puis en Amérique du Nord) ; c'est une des études les plus connues, on l'apprend en général dès la première année de licence : après l'observation de la perturbation exceptionnelle de la dynamique des populations de plusieurs espèces d'oiseaux, à de nombreux endroits dans le monde, les analyses chimiques et biochimiques ont montré que le DDT (DichloroDiphénylTrichloroéthane), très largement utilisé depuis le milieu des années 1940 pour lutter contre les insectes nuisibles (ravageurs de cultures, porteurs de maladies) et son produit de dégradation le DDE (DichloroDiphényldichloroÉthylène) étaient responsables de ce déclin. Outre leur effets sur les insectes, ces produits se sont dispersés dans l'environnement, ont pollué les eaux de rivières, et ont **bio-amplifié**³ jusqu'aux plus hauts niveaux trophiques, altérant au passage les processus de calcification des coquilles d'œufs, les rendant extrêmement fragiles, et diminuant fortement le succès reproducteur des oiseaux.⁴

2.2 Bio-essais

Les analyses physico-chimiques d'un milieu ne suffisent pas à définir la dangerosité éventuelle d'un polluant (Fent, 2004 ; Alvarenga *et al.*, 2007 ; Manzano *et al.*, 2014). L'estimation, l'évaluation de l'écotoxicité d'un polluant, comme les ETMs, est basée sur la réalisation de tests biologiques, bio-tests ou bio-essais. Ces *outils* de mesure indispensables offrent une information plus intégrée des effets de la substance testée et complètent ainsi les analyses chimiques préalablement réalisées. Ces tests sont très largement effectués en laboratoire (ils peuvent néanmoins prendre place *in situ*) et consistent en la mise en contact, plus ou moins long, d'un organisme biologique, bio-indicateur animal, végétal, micro-organique, avec la substance étudiée. Afin d'être

¹ Pour en savoir plus : Friberg *et al.*, 1974 ; Kasuya, 2000 ; icett.or.jp/english/

² Pour en savoir plus : Kurland *et al.*, 1960

³ Cf. Glossaire à « bioamplification »

⁴ Pour en savoir plus : Carson, 1962 ; Hickey *et al.*, 1968 ; Peakall, 1970 ; Ratcliffe, 1970 ; http://web.stanford.edu/group/stanfordbirds/text/essays/DDT_and_Birds.html

normalisés, et donc reconnus non seulement par la communauté scientifique, mais également par les partenaires industriels, réglementaires et financiers, ils répondent à tout ou partie d'un ensemble de critères : simplicité, reproductibilité, rapidité, sensibilité, représentativité, coût limité (Walker *et al.*, 2006 ; Ramade, 2007 ; Van Coillie & Parent, 2011). Ces tests sont nombreux, très variés et dépendent de nombreux paramètres.

2.2.1 Paramètres¹

Comme mentionné plus haut, les tests écotoxicologiques, réalisés dans un contexte diagnostique et non pas de recherche fondamentale, se doivent et font l'objet de processus de standardisation. Néanmoins, il n'existe pas un seul type de bio-essais, et les paramètres de réalisation restent donc relativement variables entre deux tests. La nature du polluant mise à part, on peut globalement regrouper ces différences en deux catégories : l'exposition et la cible.

2.2.1.1 Exposition

L'intensité, l'importance de l'écotoxicité d'un polluant et de la réponse d'un organisme à ce polluant dépend de plusieurs facteurs :

- la forme du polluant : cette assertion est particulièrement vraie pour les ETMs. Il est ainsi prouvé que le chlore sous forme libre est beaucoup plus toxique que sous forme chloramine (Merkens, 1958 reporté par Brungs, 1973). Il en est de même pour d'autres métaux (Patra *et al.*, 2004) comme l'arsenic (Tang & Miller, 1991), l'aluminium (Kochian, 1995) ou le plomb et l'étain (Murkowski & Skórska, 2008). Les changements de forme, et ici d'écotoxicité, sont principalement tributaires des conditions d'acidité ou d'alcalinité du milieu (sol, eau naturelle, rejet anthropique) comme montré dans la [Figure I.6](#) ;

¹« Alle Dinge sind ein Gift und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis macht, das ein Ding kein Gift ist. »

« Dosis sola facit venenum. »

« Rien n'est poison, tout est poison. Seule la dose fait le poison. »

Paracelse (1493-1541), médecin, astrologue et alchimiste suisse.

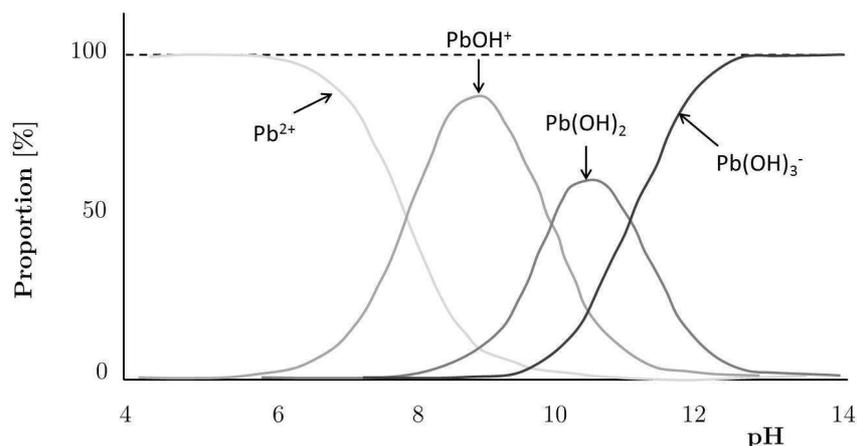


Figure I.6. Répartition des différentes formes métalliques du plomb Pb en fonction du pH (Source : Trémillon, 1993).

- le mode d'exposition : inhalation, ingestion, imbibition, diffusion... Le protocole et le mode d'exposition d'un organisme biologique à un polluant dépendent essentiellement de l'indicateur biologique sélectionné (animal, végétal, microbiologique), de la finalité du test (pollution chronique ou aigüe) et des critères d'évaluation "end-point" ;
- la durée et la dose/concentration d'exposition : ces deux critères distinguent deux types de pollution, et donc de tests écotoxicologiques, que sont les pollutions chroniques et les pollutions aigües (Figure I.7).

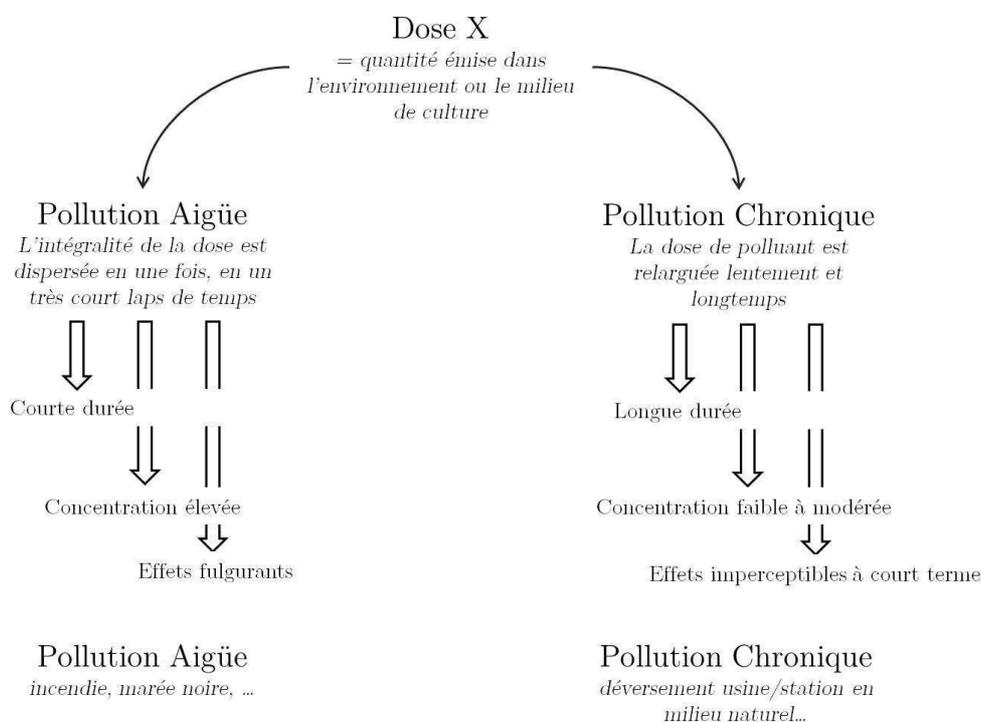


Figure I.7. Comparaison de deux types de pollution à partir d'une même dose polluante.

2.2.1.2 Organismes vivants

Qu'il s'agisse d'une étude d'écotoxicité chronique ou aigüe, les tests entrepris sont ciblés sur des organismes biologiques vivants : on parle de bio-indicateurs¹, ou indicateurs biologiques. Ces individus (végétaux, animaux ou microbiologiques) ou ces groupements d'espèces (dans le cas d'études plus larges ; *e.g.* **micro- ou méso-cosmes**) sont utilisés comme outils d'évaluation de la qualité de l'environnement : ils renseignent sur certaines caractéristiques écologiques du milieu (physico-chimique, climatique, biologique, fonctionnelle...), sur la présence ou les effets de perturbations de l'environnement, comme les polluants chimiques.

En laboratoire, un bio-indicateur doit pouvoir survivre hors du milieu naturel et tolérer différentes variations de paramètres abiotiques (pH, température...). Lorsque, pour des bio-indicateurs individuels, les effets relevés sont proportionnels à la quantité de polluant(s) dans l'environnement on parle de **dose- ou concentration-réponse**.

La présence de polluants physico-chimiques dans l'environnement implique des modifications fonctionnelles de l'écosystème : répartition des espèces, réduction voire disparition d'espèces sensibles, augmentation de l'abondance des espèces résistantes/opportunistes, *etc* (Figure I.8). Dans le cadre d'études *in situ*, un "bon" bio-indicateur doit ainsi :

- être abondant ou absent du territoire concerné ;
- être facilement détectable/dénombrable ;
- tolérer les contaminants avec des effets sub-létaux ;
- avoir une installation et un suivi simples, rapides, faciles et peu coûteux.

¹ On ne traitera pas ici des **biomarqueurs** biochimiques (Lagadic *et al.*, 1997).

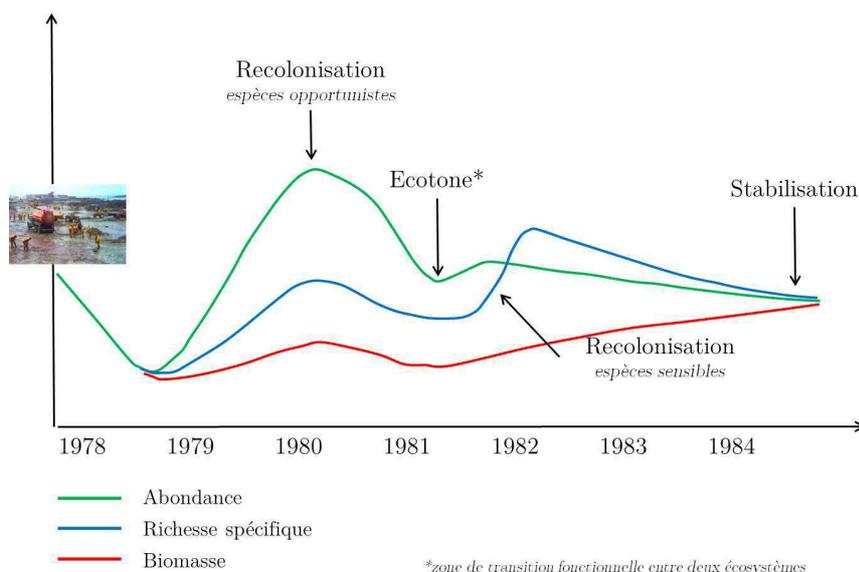


Figure I.8. Evolution des peuplements benthiques dans les abers à la suite du naufrage de l'Amoco Cadiz (Source : Glémarec, 1986).

Parmi les bio-indicateurs les plus souvent utilisés on notera :

- pour les animaux : le poisson zèbre *Danio rerio*, la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792 ; anciennement *Salmo gairdneri*, Richardson, 1836 ; Billard, 1989), ou encore le chironome *Chironomus riparius* ;
- pour les végétaux : en général des espèces agricoles à fort potentiel commercial comme le blé *Triticum aestivum*, le soja *Glycine max*, la tomate *S. lycopersicon...* ;
- pour les microorganismes : la bactérie marine *Vibrio fisheri*, l'algue dulçaquicole *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Focus : Imposé aux installations classées, dans le cadre de l'application de la DCE (Directive EC, 2000) en droit français et afin d'établir les bases de la redevance pollution spécifique à chaque établissement, le test de toxicité aigue¹ d'immobilisation des larves de daphnies (ISO 6341, 1989) est un des tests écotoxicologiques les plus utilisés. La daphnie *Daphnia magna* (Figure I.9) est un microcrustacé d'eau douce (6 mm *maximum*), de l'ordre des Cladocères, largement ubiquiste dans l'hémisphère nord (Boillot, 2008).

¹¹ Il existe de nombreux tests impliquant la daphnie, évaluant la toxicité aigue comme la toxicité chronique d'une substance.

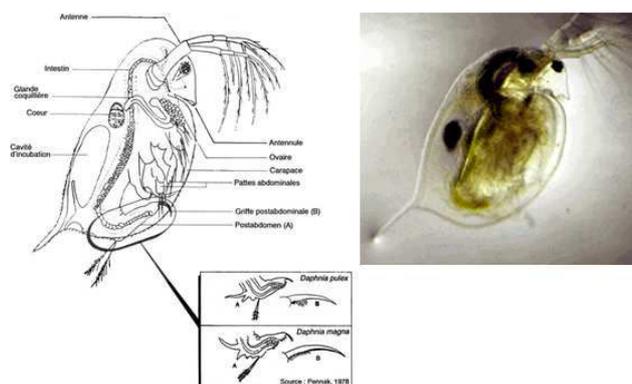


Figure I.9. Anatomie d'une daphnie *Daphnia magna*.

Son mode de reproduction **parthénogénétique** (en conditions environnementales favorables ; lorsque les conditions environnementales deviennent moins favorables, comme en cas de surpopulation, la reproduction sexuée prévaut ; Hebert & Ward, 1972), sa petite taille et son court cycle de vie (la maturité sexuelle est atteinte 6 à 8 jours après l'éclosion) sont autant de critères qui rendent la manipulation et l'élevage de la daphnie relativement aisés (*cf.* Figure V.2 ; Adema 1978 ; Zeman, 2008). Si le test en lui-même est relativement simple à réaliser (*cf.* figure I.10), on notera malgré tout la charge financière qu'impose un tel test. En effet, l'élevage de daphnies nécessite un investissement en temps et en matériel non négligeable. Même réalisés par des laboratoires extérieurs agréés, ces tests écotoxicologiques restent chers.

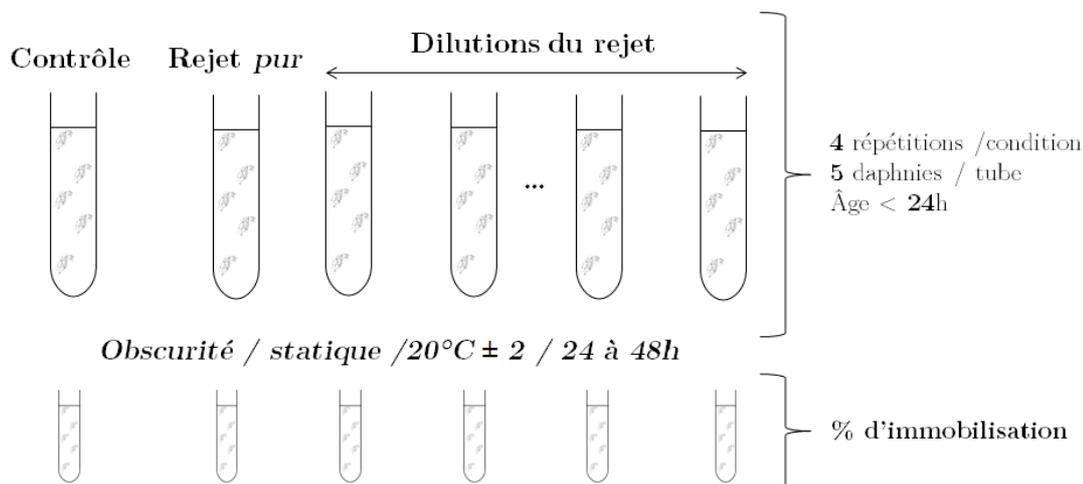


Figure I.10. Protocole du test d'inhibition de la mobilité (Source : ISO 6341).

Remarque : la généralisation de réponses écotoxicologiques d'une ou plusieurs espèces en contact avec un ou plusieurs polluants en mélange est un risque à considérer dans tout bilan écotoxicologique (Cairns & Pratt, 1989 ; Hernando *et al.*, 2005). En effet l'extrapolation ne doit jamais faire oublier que les indices générés (CE_{50} , DL_{50} , NOEC, LOEC) ne sont que des indices individuels.

2.2.2 Mesures d'écotoxicité

L'écotoxicité d'une substance, d'un rejet s'évalue de différentes façons, grâce notamment au développement d'indices, de mesures d'écotoxicité, que l'on peut catégoriser en 3 groupes : les doses, les concentrations et les seuils (Sources : Ramade, 2007 ; Van Coillie & Parent, 2011). Dans tous les cas, plus une dose, une concentration ou un seuil d'effet est faible, plus la substance polluante, simple ou mélange, est toxique.

2.2.2.1 Doses : létales, d'effet ou d'inhibition

Comme mentionné précédemment, une *dose* est une quantité administrée à un individu. Une dose peut être létale ou sublétale, provoquant tour à tour :

- la mort (Dose Létale DL en français, ou *Lethal Dose* LD en anglais) d'un individu ; ou
- un effet (Dose d'Effet/Efficace DE, ou *Effect/Effective Dose* ED) sur un processus biologique, par exemple la croissance ; et/ou
- une inhibition (Dose d'Inhibition/Inhibitrice DI, ou *Inhibition/Inhibitory Dose* ID) d'un processus biologique, par exemple la production photosynthétique.

Remarque : si une inhibition est un effet alors une DI est une DE. En revanche, un effet n'est pas toujours le résultat d'une inhibition, donc une DE n'est pas une DI. Ces mesures, développées et mises en place à partir des années 1950 et 1960, sont exprimées en fonction du pourcentage de l'effet (létal ou sublétal) provoqué. Ainsi, une DL_{50} représente la dose provoquant la mortalité de 50 % de la population testée. Ce sont en général ces mesures moyennes (DL_{50} , DE_{50} , DI_{50}) qui sont les plus utilisées. On note malgré tout que ces indices sont dépendant de nombreux facteurs : la nature du composé testé, la durée du test, le milieu et les conditions expérimentales, la cible (groupe taxonomique, espèce, âge...), le mode d'administration...C'est d'ailleurs le mode d'administration qui rend les DL, DE et DI presque non pertinentes d'un point de vue environnemental, puisqu'en conditions naturelles on ne peut pas contrôler ou administrer une dose de polluant. Ces mesures sont typiquement utilisables *in vitro*, où les conditions expérimentales sont entièrement monitorées.

2.2.2.2 Concentrations : létales, d'effet ou d'inhibition

Il existe, comme pour les doses, trois grandes catégories de concentrations de polluant, létales ou sublétales, impliquant des effets sur :

- la survie d'un individu (Concentration Létale CL en français, ou *Lethal Concentration* LC en anglais) ; ou
- un processus biologique (Concentration d'Effet/Efficace CE, ou *Effect/Effective Concentration* EC) par exemple la germination ; et/ou
- l'inhibition d'un processus biologique (Concentration d'Inhibition/Inhibitrice CI, ou *Inhibition/Inhibitory Concentration* IC), par exemple la diminution d'activités enzymatiques.

Un peu plus récentes (1970-1975), et surtout environnementalement plus réalistes que les doses, ces mesures sont très généralement exprimées en valeur moyennes¹ (50 %) 1/ de l'effet léthal ou sublétal mesuré, ou 2/ de la population touchée. Ces tests sont en général plus longs (> 4 jours) que les tests "doses" (24, 48, 96 heures maximum), et dépendent également de la nature du polluant, du protocole expérimental et de la cible biologique choisie.

2.2.2.3 Seuils de toxicité

Les seuils de toxicité sont les valeurs pour lesquelles :

- on n'observe pas d'effet (Concentration Sans Effet Observé CSEO, ou *No Observed Effect Concentration* NOEC) ;
- on observe le plus petit effet (Concentration Minimale avec Effet Observé CMEO, ou *Lowest Observed Effect Concentration* LOEC).

Ces valeurs seuil sont à envisager avec précaution, et sont de plus en plus remises en cause par la communauté scientifique (Crump, 1984 ; Hoekstra & van Ewijk, 1993 ; Chapman *et al.*, 1996 ; Jager *et al.*, 2006 ; Fox *et al.*, 2012). Elles tendent en effet à la sous-estimation de l'action et des conséquences environnementales d'un produit toxique (ce n'est pas parce que l'on ne dispose pas des outils pour les mesurer qu'il n'y a pas d'effet²), et ne sont pas adaptables à des expositions multiples (*e.g.*

¹ On note cependant quelques exceptions : CL, CE ou CI ₂₀ ou ₁₀.

² Assertion similaire à celle du *Mythe du Zéro* (Currie, 1999) : ce n'est pas parce qu'un élément, qu'une substance n'est pas détecté ou mesuré qu'il est absent de l'échantillon analysé.

RITS). Dès 1974, Woodwell définissait ces valeurs seuils comme *permissives* : elles autorisent a priori un certain degré de pollution.

2.2.3 Bilan

Les tests écotoxicologiques et l'utilisation d'indicateurs biologiques sont donc un moyen *relativement* simple et rapide d'évaluer l'impact d'un ou de plusieurs polluants en mélange sur un écosystème particulier, en extrapolant *parcimonieusement* les résultats écotoxicologiques d'une ou plusieurs espèces, sans entreprendre la tâche danaïdienne de considérer tous les éléments (biotiques et abiotiques) de cet écosystème. Le [Tableau I.4](#) récapitule les différents tests utilisables en écotoxicologie.

Tableau I.4. Récapitulatif des différentes modalités de réalisation d'essais écotoxicologiques (Source principale : Ramade, 2007).

Test	Létalité / Inhibition	Sublétalité	
	<i>Toxicité aigüe</i>	<i>Toxicité chronique</i>	
Indice	CL ₅₀ /CE ₅₀ ; DL ₅₀ /DE ₅₀	NOEC, LOEC, CE ₅₀ ,	
Activité biologique	Survie	Croissance, motilité, reproduction, photosynthèse, bioluminescence, mutation génétique, tératogénèse...	
Exposition	Quelques heures à plusieurs jours	Plusieurs semaines à quelques mois	
Système testé	Aquatique/terrestre	Aquatique	Terrestre
Indicateur biologique *	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Folsomia candida</i>
	<i>Danio rerio</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	<i>Cantarus aspersus</i>
	<i>Virio fisheri</i>	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	<i>Eisenia foetida</i>
	<i>Eisenia foetida</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	...

Références	Adema, 1978	Biesinger & Christensen, 1972	
	Spurgeon <i>et al.</i> , 1994 ;	Sherry <i>et al.</i> , 1994	Herbert <i>et al.</i> , 2004
	Westerfield, 2000 ;	Bohorquez-Echeverry & Campos-Pinilla, 2007	Baurand <i>et al.</i> , 2013
	Mortimer <i>et al.</i> , 2008	Stalter <i>et al.</i> , 2010	Goussen, 2013

* un même bio-indicateur peut souvent être utilisé dans des tests de toxicité aigüe et chronique

On note que des bio-essais utilisant des organismes comme *D. magna* ou *V. fisheri*, spécifiquement développés pour évaluer l'écotoxicité de polluants dans des milieux aquatiques et/ou marins, peuvent parfaitement être adaptés à l'évaluation de la toxicité des sols *via* l'étude de leurs **lixiviats** (Loureiro *et al.*, 2005 ; Alvarenga *et al.*, 2008).

2.3 Polluants

2.3.1 Généralités

En science comme ailleurs, chaque mot a son importance, aucun terme n'est *a priori* anodin : un vocable n'est que très rarement substituable à un autre, ce qui permet d'éviter les confusions, raccourcis et autres dyscompréhensions. Ainsi, si un **contaminant** est une substance ou élément, physique, chimique ou biologique, émis dans un milieu naturel, en quantité anormalement forte, il ne devient **polluant** (Moriarty, 1990) ou **xénobiotique** (Butler, 1978 ; Ramade, 1998) uniquement s'il provoque des effets biologiques délétères sur l'environnement (Figure I.9).

Les polluants peuvent être classés différemment selon qu'ils sont d'origine *naturelle* (élément dont le cycle ou la répartition naturelle est perturbé, en général par l'Homme) ou *de synthèse* (élément totalement créé par l'Homme, n'existe pas à l'état naturel). On distingue dans chacune de ces deux catégories, trois types de polluants¹ : physique, chimique et biologique. Le Tableau I.5 présente des exemples de substances polluantes, en particulier pour les milieux aquatiques, classées selon ces critères qualitatifs.

On note que l'on peut également distinguer les polluants *primaires*, déversés dans le milieu naturel (directement ou non), des polluants *secondaires*, produits des réactions chimiques des premiers entre eux ou avec les composants de l'environnement dans lequel ils sont.

¹ On note qu'il existe aujourd'hui un quatrième type de polluant/pollution : les nuisances esthétiques (*e.g.* : la dégradation de l'espace par des aménagements mal conçus). Ce dernier type de pollution, subjectif, ne sera pas considéré et/ou traité dans la suite de ce travail

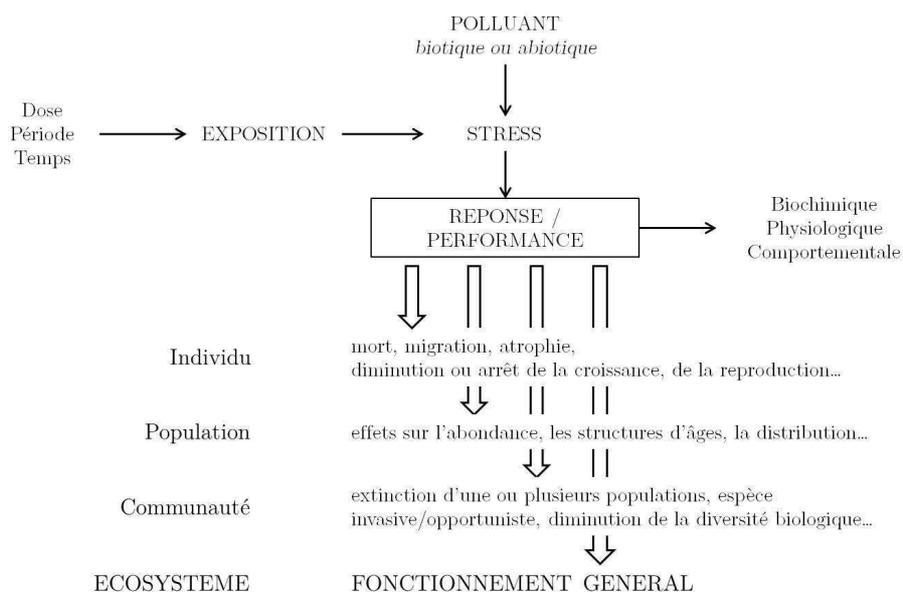


Figure I.11. Exemple d'une succession de réactions écotoxiques globales.

Tableau I.5. Récapitulatif des différents types de polluants existants et de leurs effets biologiques. (Source principale : Ramade, 2007).

Type de polluant	Physique	Chimique	Biologique
Exemples	Radiations ionisantes, pollutions thermiques pollutions particulaires ...	Engrais, pesticides HAP, COV hydrocarbures métaux matières organiques ...	Bloom : algues, phytoplancton, bactéries champignons espèces animales invasives ...
Sources principales	Centrales électriques installation nucléaires pots d'échappements ...	Agroalimentaire tanneries, TS incinérateurs industries pétrolière ...	Agroalimentaire papeterie rejets domestiques ...
Effets	Altérations génétiques modifications des conditions physicochimiques du milieu récepteur, ...	Mortalité, bioaccumulation, biomagnification, altérations démographiques, ...	Turbidité, eutrophisation, anoxie, dérèglements démographiques, ...

2.3.2 Ecotoxicité de polluants chimiques : *Focus sur les métaux*

2.3.2.1 Métaux lourds ou ETMs ?

L'écotoxicité d'un polluant chimique dépend de plusieurs paramètres, dont la dose, le temps et la période d'exposition, mais également la **biodisponibilité** de l'élément. Ce dernier facteur est particulièrement important lorsqu'il est question des substances métalliques. En effet, selon sa **spéciation**, c'est-à-dire selon l'état physique dans lequel il se trouve (forme ionique libre, complexé avec de la matière organique...), un métal sera plus ou moins biodisponible. La spéciation dépend des caractéristiques physico-chimiques propres du polluant, de sa **persistance** et des caractéristiques **abiotiques** du milieu récepteur, notamment le pH : des bouleversements climatiques (*e.g.* : augmentation des pluies acides) peuvent ainsi provoquer, entre autres, des relargages massifs d'éléments polluants. On note que les éléments métalliques ne sont pas biodégradables : leur persistance dans un milieu est théoriquement infinie, potentialisant d'autant plus leurs effets sur l'environnement (*e.g.* : **bioaccumulation** le long de la chaîne trophique ; Amiard *et al.*, 1991 ; Caurant *et al.*, 1999 ; Colaço *et al.*, 2006).

Le terme "métaux lourds" (Bryan, 1984) est aujourd'hui très souvent associé à un potentiel degré de toxicité et d'écotoxicité. C'est la raison pour laquelle on lui préférera le terme général d'"élément trace métallique" ou ETMs dans la suite de ce manuscrit. Les ETMs sont naturellement présents dans l'environnement, très ubiquistes (sols, roches, air, eau...). Si leur abondance *naturelle* (en général, inférieure à 0,1%) n'est pas homogène, selon le milieu, la région sur Terre, l'élément *etc* (Cannon *et al.*, 1978 ; Juste *et al.*, 1995 ; Reichman, 2002), ils sont néanmoins assujettis aux mêmes lois physiques : ils présentent notamment la particularité d'être de petits atomes au nombre de protons et de neutrons élevé, ce qui leur confère de hauts poids moléculaires¹ (supérieur à $5 \cdot 10^6 \text{ g m}^{-3}$; Holleman & Wiberg, 1985). On parle également de métaux de transition. Environ 40 éléments correspondent à cette définition² (*cf.* Figure V.1). Parmi ces ETMs, on distingue deux catégories : les métaux essentiels et les non essentiels (Figure I.10).

¹ Ce qui explique l'appellation initiale : métaux *lourds*.

² Mais là encore les critères de sélection et les définitions dépendent très largement des auteurs (Eshghi Malayeri, 1995).

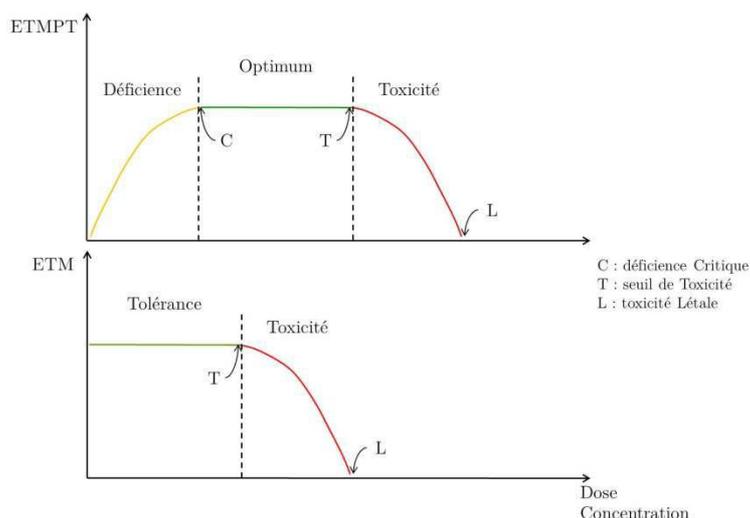


Figure I.12. Courbe dose-réponse générale pour les éléments trace métalliques essentiels, potentiellement toxiques (ETMpt), et les éléments trace métalliques non essentiels (ETMss)(Source : Berry & Wallace, 1981).

Les métaux essentiels aux organismes vivants sont des ETMpt, Eléments Traces Métalliques potentiellement toxiques. Impliqués dans de nombreux processus biologiques (enzymes, pigments respiratoires, cofacteurs...), ils ne sont pas substituables les uns avec les autres (Eskew *et al.*, 1983 ; Aller *et al.*, 1990 ; Egli *et al.*, 1999 ; Mäkönen *et al.*, 1999 ; Vesik *et al.*, 1999 ; Reeves & Baker, 2000) : une déficiency est alors tout aussi néfaste pour l'organisme qu'une trop forte concentration. Les métaux non-essentiels, ETMss¹, sans fonction biologique connue, sont quant à eux toxiques même à de très faibles concentrations. Il est pourtant nécessaire de ne pas considérer ces catégories comme immuablement fixées : 1/ un élément peut être essentiel pour un animal et non-essentiel pour un végétal, et *vice versa* (e.g. le chrome et l'antimoine ETMss pour les plantes, ETMpt pour les animaux ; Markert, 1993) ; 2/ les travaux de recherches produisent tous les jours des résultats qui peuvent *a priori* mettre à mal les théories et les règles précédemment établies. Si le statut d'éléments comme le cuivre Cu ou le zinc Zn a été défini *essentiel* relativement tôt (Sommer & Sorokin, 1928 ; Lipman & Mc Kinney, 1931), on peut néanmoins citer le cas du nickel Ni². Malgré la démonstration de Bartha et Ordal (1965) concernant le besoin de Ni pour le développement de deux souches bactériennes, cet élément a longtemps été considéré comme un ETMss, sans rôle biologique. Nielsen et Ollerich (1974) sont parmi les premiers à avoir défini le nickel comme un *nouvel élément trace essentiel*. Ce

¹ ETMss : Elément Trace Métallique *stricto sensu*

² N.B. : l'existence de plantes nickelophytes confirme le caractère essentiel de cet ETM. Ainsi le latex du *Serbetia acuminata* peut contenir plus de 60000 ppm de nickel, soit jusque 300 g kg⁻¹ de matière sèche.

changement de catégorie s'est fait sur la base de l'observation de symptômes en cas de *déficience* en Ni chez les animaux, les microorganismes et les plantes (Eskew *et al.*, 1984 ; Denkhaus & Salnikow, 2002 ; Seregin & Kozhevnikova, 2005).

Remarque : Les chlorures Cl et fluorures F ne sont pas des métaux, mais des minéraux halogénés (*cf.* [Figure V.1](#)), systématiquement présents dans les eaux usées, et plus ponctuellement dans les RITS, en concentration beaucoup plus importante que les autres minéraux (Na, Mg, Ca, *etc.*). Considérant leur capacité à former des complexes avec certains éléments métalliques (e.g. F/Al/B ; Sancey, 2011), il a paru important de resenser leurs effets sur les plantes en les intégrant aux deux tableaux suivants ([Tableaux I.6](#) et [I.7](#)).

2.3.2.2 ETMpt : Effets bénéfiques

Les ETMpt appartiennent à la classe d'éléments nommés nutriments *essentiels* ou encore *oligoéléments* : élément essentiel à *faible* dose. Le bore a un statut bâtard dans ce contexte : élément aux propriétés métalliques non affirmées (mauvaise conductivité, atomes empilés non régulièrement...), il fait néanmoins partie de la classe des *métalloïdes*¹ et des *oligoéléments*. Il est qui plus est largement utilisé dans l'industrie du TS. C'est la raison pour laquelle, au cours de cette étude, le bore est classé dans les ETMpt.

En ce qui concerne le monde végétal, les ETMs considérés ETMpt sont : le bore, le cuivre, le fer, le manganèse, le molybdène, le nickel et le zinc (Baker & Senft, 1995). Ils peuvent être classés selon leur abondance dans les plantes de la manière suivante : Fe > Mn > B > Zn > Cu > Ni > Mo. Le [Tableau I.6](#) présente une synthèse bibliographique des différents rôles *bénéfiques* connus des ETMpt chez les plantes.

2.3.2.3 ETMpt et ETMss : Effets délétères

Si certains éléments métalliques sont bénéfiques (*vide supra* 2.3.2.2.), d'autres sont *de facto* toxiques pour les différents organismes en présence. Dans le domaine végétal, les ETM *stricto sensu* sont : l'aluminium, l'argent, l'arsenic, le cadmium, le chrome, l'étain le mercure et le plomb. Le [Tableau I.7](#) regroupe une liste non-exhaustive des différents effets négatifs des ETMs (ETMpt et ETMss) chez les plantes.

¹ Etat fondamental 1s² 2s² 2p¹

Ce tableau ne présente pas les interactions entre les différents ETMs (**antagonisme**, **addition**, *etc.*) (Siedlecka, 1995).

Tableau I.6. Liste non exhaustive et synthétique des rôles physiologiques et morphologiques, directs ou indirects des 7 ETMs considérés ETMpt pour les végétaux (cases grisées)(Sources : *Vallee, 1976 ; Bryan, 1984 ; Mengel & Kirby, 1987 ; Adriano, 1986 ; Welch, 1981 ; Klucas et al., 1983 ; Gerendas et al., 1999 ; Mahmood & Islam, 2006 ; Chatterjee et al., 2006 ; Hänsch & Mendel, 2009*).

Elément	B	Cl	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Zn
Photosynthèse								
Respiration								
Croissance *								
Immunité **								
Reproduction								
Métabolisme Général	Azote	Energie	Azote Carbone	Azote	Azote	Azote Soufre	Uréase	Energie
Métabolisme ADN, ARN								
Métabolisme nutrition ***								
Synthèse protéines								
Synthèse phytohormones								
Synthèse lignine								
Transport protéines, électrons								

* *e.g.* : division cellulaire, croissance organique *etc...*

** *e.g.* : réponse aux stress oxydatifs

*** *e.g.* : métabolisme des oses, acides aminés et acides gras

Tableau I.7. Liste synthétique et non exhaustive¹ des effets délétères des ETMs (ETMPT et ETMss) sur les plantes (cases grisées)(Sources : Tableaux V.1.a et V.1.b).

Elément	B	Cl	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Zn	Al	Ag	As	Cd	Cr	Sn	F	Hg	Pb
Germination																	
Floraison																	
Fructification																	
Photosynthèse																	
Croissance *																	
Immunité **																	
Fonctions cellulaires																	
Mortalité																	
Respiration																	
Transpiration																	
Métabolisme général																	
Production pigments																	
Différences locales ***																	
Effets externes ****																	

* *e.g.* : division cellulaire, croissance organique, biomasse *etc...*

** *e.g.* : diminution des réponses aux stress oxydatifs ET augmentation des réactions oxydantes au sein des cellules

*** *e.g.* : différences observées entre les racines, la tige et les feuilles (séquestration, accumulation, translocation)

**** *e.g.* : chlorose, nécroses, malformations, génération de feuilles/racines adventices *etc...*

¹ Tous les ETM ne sont pas autant étudiés les uns que les autres. C'est la raison pour laquelle certaines altérations sont plus détaillées que les autres.

Daphnia magna est LE microcrustacé dulçaquicole par excellence. Sa biologie est très largement connue, et cet organisme est relativement sensible aux polluants en général, aux substances chimiques en particulier. Les différents tests écotoxicologiques l'impliquant (évaluation de l'écotoxicité aigüe et chronique) font partie des tests les plus utilisés, mais également exigés par les différentes réglementations nationales ou internationales. Aucun système n'est malheureusement parfait, et le test "daphnie" le premier. Afin d'évaluer l'écotoxicité de RITS *via* un "*outil écotoxicologique*", il convenait de trouver un organisme biologique pouvant compléter ou contrebalancer les diagnostics réalisés à partir des résultats des "tests daphnies". Le choix s'est alors porté sur la laitue, *Lactuca sativa* (Linné, 1753).

3 *LACTUCA SATIVA* (L.)

3.1 Généralités

3.1.1 Historique

Si certains légumes ont été sélectionnés et domestiqués très tard (Zohary *et al.*, 2012), nombreuses sont les espèces dont l'exploitation remonte aux origines de l'agriculture (10000 à 7000 av JC), et probablement en plusieurs lieux (Proche Orient, Asie, Amérique Centrale... ; Harlan, 1975 ; Haudricourt & Hedin, 1943). Les voyages des marchands et explorateurs, mais aussi les guerres sont pour beaucoup dans l'introduction de certains légumes et fruits en Europe (Chauvet, 1985, 1986) :

- les Grecs ont développé les melons, concombres, radis et autres panais ;
- aubergines, choux fleurs, pastèques et épinards ont été introduits par les Arabes et les Juifs entre le X^e et XV^e siècle ;
- les pommes de terre, haricots, tomates, courges et poivrons sont rapportés des “Indes” à partir de 1492 ;
- les choux de Bruxelles, pissenlits et endives n'ont quant à eux été cultivés en Europe qu'à partir du XVIII^e siècle.

La laitue *Lactuca* sp. fait partie de ces très anciens genres cultivés aussi bien en Chine dès le VII^e siècle avant JC (Laufer, 1919) que bien avant la période pharaonique Egyptienne (environ 4500 ans avant JC, soit 1500 ans avant les premiers pharaons). Cultivées également pendant l'Antiquité gréco-romaine, les différentes espèces de laitues étaient connues pour leurs effets sédatifs, narcotiques et analgésiques¹, mais aussi anti oxydants et anti bactériens (présence de lactucarium ; Diderot & Le Rond D'Alembert, 1779 ; Ducan, 1821 ; Mérat & de Lens, 1837 ; Munch *et al.*, 1933 ; Edziri *et al.*, 2011), voire même mystique (importance de la laitue dans le culte d'Adonis, qui, mortellement blessé aurait été allongé par Venus sur un lit de laitues ; Rochette, 1851). Aujourd'hui, environ 25 millions de tonnes de laitues (et chicorées) sont produites par an (FAOStat, 2014) dans le monde ; 1,3 % de cette production était française en 2012.

¹ Les pythagoriciens la nomment d'ailleurs la « plante des eunuques » pour les propriétés anti aphrodisiaques du lactucarium.

3.1.2 Classification, systématique et commercialisation

Le genre *Lactuca* sp. est un des plus importants de la famille des **Astéracées** (anciennement Composées Chicoriacées). A la fin du XIX^e siècle, on en comptait une quarantaine d'espèces, 150 à 180 dans les années 1950 ; on dénombre aujourd'hui plus de 1500 variétés commerciales, regroupées en 3 espèces principales : *Lactuca indica*, *Lactuca serriola* et *Lactuca sativa*, toutes les trois décrites par Linné.

Il existe 5 classes ou groupes¹ de *Lactuca sativa* L., matériel biologique choisi dans cette étude :

- les **Pommées** (ou “cabbage” en anglais), dénommées *L. sativa var capitata* ;
- les **Romaines**, ou chicons (“romaines” ou “cos”), *L. sativa var longifolia* ;
- les **Frisées** (“Summercrisps”, “Batavian crisps” ou “French crisps”), *L. sativa var crispa* ;
- les **A tiges** (“Stem” ; jusque 50 cm de haut), *L. sativa var augustana* ;
- les **Grasses** (“Leaf”, “Oil seed”), *L. sativa var laciniata*.

Les classifications, systématiques mais aussi mercantiles, dépendent de nombreux aspects morphologiques comme la couleur, la taille, la forme générale des feuilles, mais aussi des semences (Plages, 1986). C'est ainsi que l'on peut entendre dire, en plus des classes “romaines” ou frisées, de laitues “beurre” (*e.g.* La Grosse Blonde Paresseuse, connue et cataloguée par Vilmorin depuis 1854 ; Chauvet, 1985, 1986). La dénomination des variétés, sous-variétés, cultivars dépend également de caractéristiques physiologiques, comme une montaison lente ou retardée (*e.g.* la Kinemontepas).

¹ Les termes « classes » ou « groupes » sont systématiquement faux, mais nécessaires considérant la variabilité variétale de cette espèce.

3.2 Caractéristiques biologiques et physiologiques

Cette **herbacée dicotylédone** à feuilles glabres et ovales (on parle aussi de légume-feuille en parlant de la laitue) est une plante de type **C3** : elle incorpore le carbone atmosphérique lors de la photosynthèse strictement sous la forme de 3-phosphoglycérate, acide à 3 atomes de carbone (**Figure I.11.a**). Les plantes de ce type (riz, blé, soja, laitue...) sont les plus abondantes en agriculture. Ce fonctionnement s'oppose à celui des plantes de type **C4** (ex : canne à sucre, maïs...), dont le premier produit carboné est l'oxaloacétate, acide à 4 atomes de C) par le cycle de Calvin (**Figures I. 11.a et I. 11.b**).

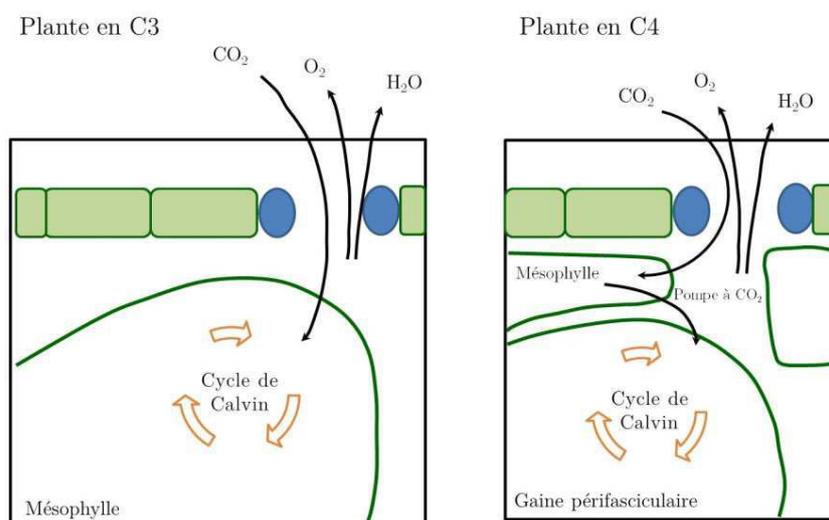


Figure I.13.a. Absorption du Carbone par des plantes dites « en C3 » et « en C4 ».

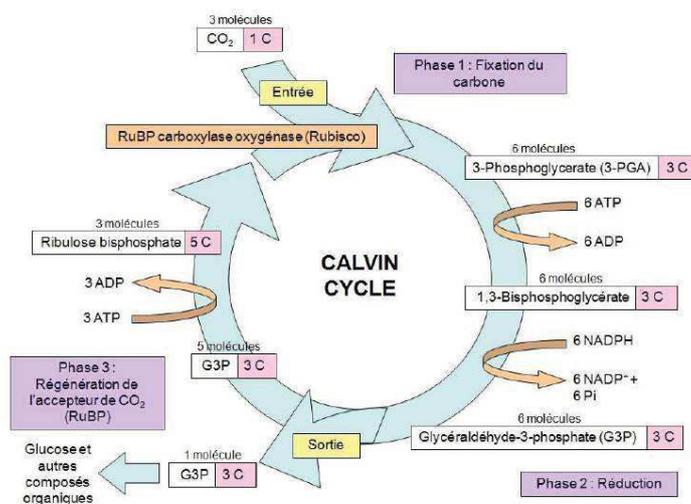


Figure I.13.b. Principales étapes du cycle de Calvin (réduction du carbone) (Boyer, 2009 d'après Mazliak, 1974).

Les laitues en général, *L. sativa* en particulier, sont des plantes **autogames** et diploïdes ($n = 8$ ou 9 ; dans le cas de *Lactuca sativa*, $n = 9$). Si l'allogamie est possible (4 à 8 %), sa probabilité augmente avec la chaleur et l'ensoleillement (Plages, 1986).

L. sativa est une plante **annuelle** : son cycle de développement se déroule sur une seule année (Figure I.12), à partir d'une semence (graine) ovoïde, striée, de couleur noire, blanche ou jaune grisâtre. Cet **akène** dispose d'une aigrette poilue pour faciliter la dissémination par le vent (anémochorie).

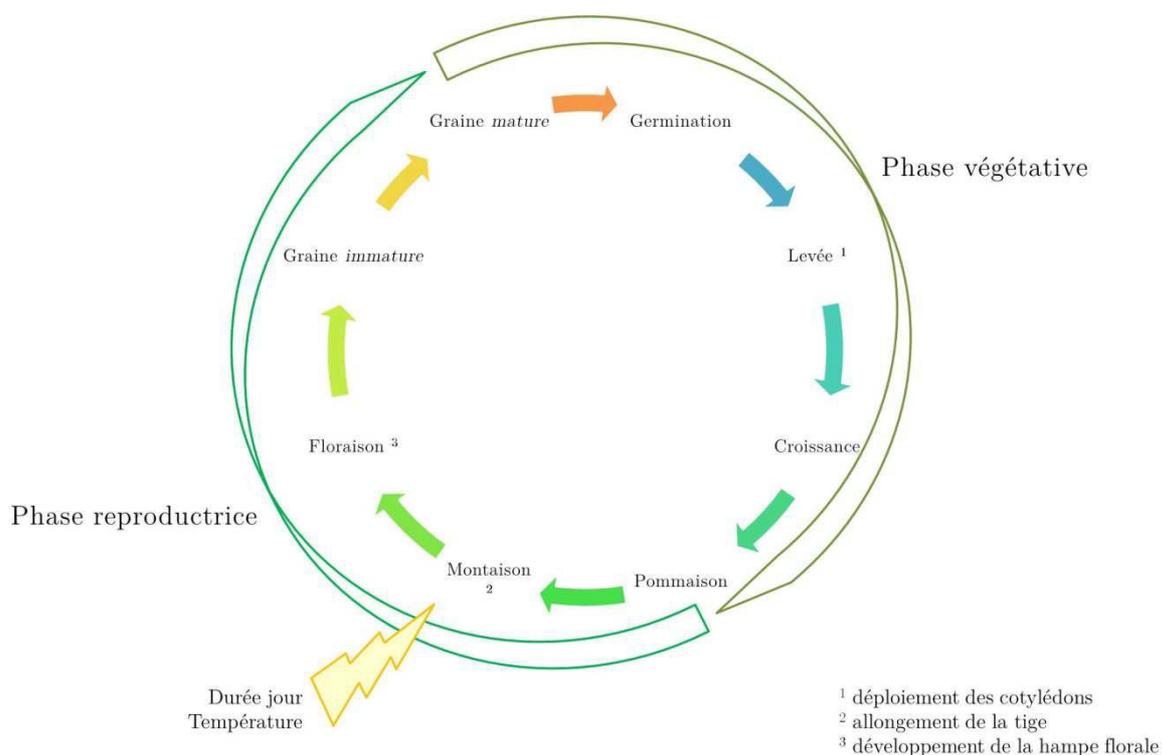


Figure I.14. Cycle de développement de la laitue.

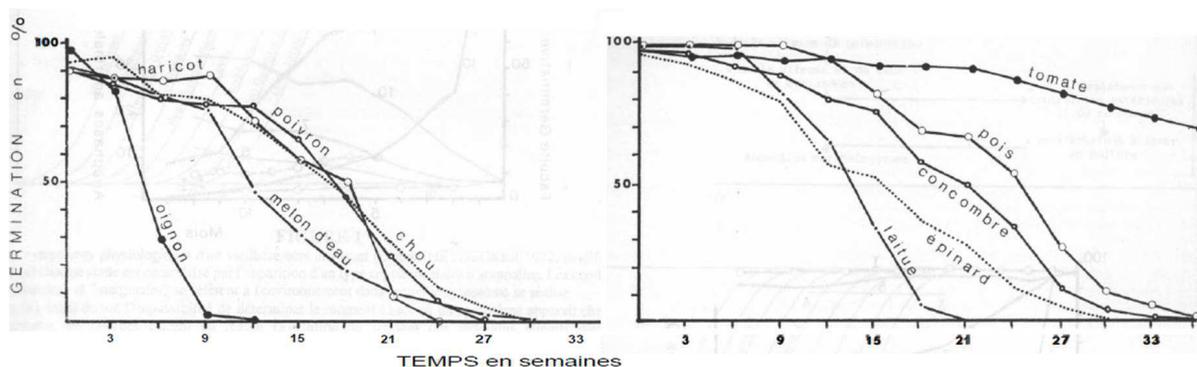


Figure I.15. Effet d'un vieillissement intensif (45°C, 80 % d'humidité relative) sur la capacité germinative de semences de différentes espèces végétales (Renard, 1985).

Thicoïpé (1997) a souligné la grande variabilité du cycle de développement : de 45 jours en période estivale à 6 mois l'hiver, la montaison est très photosensible. On distingue d'ailleurs des laitues de *printemps*, *d'été*, *d'automne* et *d'hiver*. La température influence également le développement de la plante à travers la germination et la montaison (de 0 à 25 °C ; optimum : 18 – 22 °C). Ceci explique en partie la diminution du nombre de sous-espèces ou de variétés de laitues des régions boréales et tempérées aux régions semi-arides à tropicales. Dans le cadre de la conservation des semences et de leur préservation du vieillissement, à des fins scientifiques ou strictement potagères, il convient de stocker ces semences à l'abri de la lumière, de la chaleur, et d'une trop grande humidité (Figure I.13, Renard, 1986 ; Huang *et al.*, 2003).

3.3 Bio-indicateur écotoxicologique

Comme de nombreuses espèces végétales, très souvent à intérêt agricole, la laitue est recommandée et utilisée pour la réalisation de bio-essais (FDA, 1987 ; EPA, 1996 ; OECD, 2003). Elle est utilisée au sein de notre équipe dans le cadre d'évaluation de l'écotoxicité de RITS depuis 2008.

Il existe deux types de tests écotoxicologiques impliquant la laitue : le test de germination (7 jours ; utilisé lors de ce travail de doctorat et protocole détaillé dans le point 3.3.1) et le test de croissance (28 jours ; protocole très largement détaillé dans le mémoire de doctorat de Bertrand Sancey (2011)). Ces deux tests permettent de mettre en évidence visuellement et quantitativement (*vide infra*), entre autres, les effets de RITS et/ou de solutions synthétiques sur la germination, l'élongation (racinaire et totale ; [Figure I.14](#)) et la croissance (masse et longueurs ; [Figure I.15](#)) des semences et plantules de laitue.

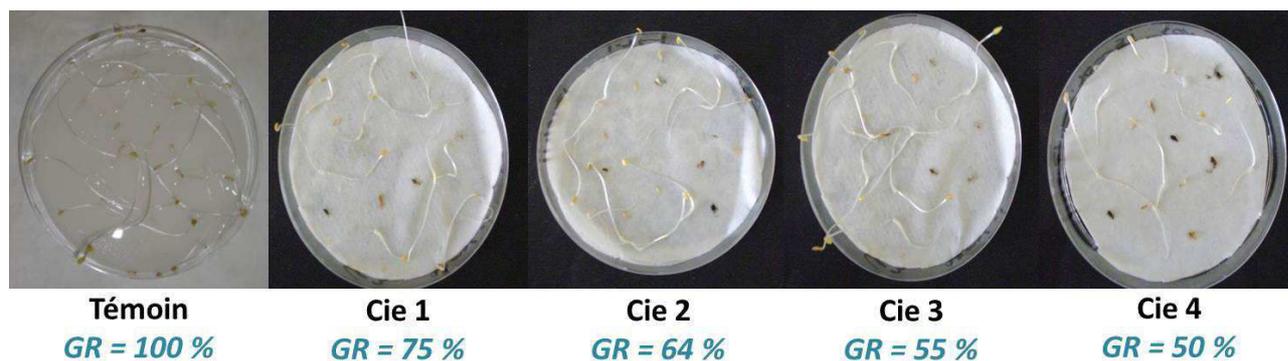


Figure I.16. Inhibition de la *germination de semences* de *L. sativa* exposées à 4 RITS industriels différents (Sancey, 2011).

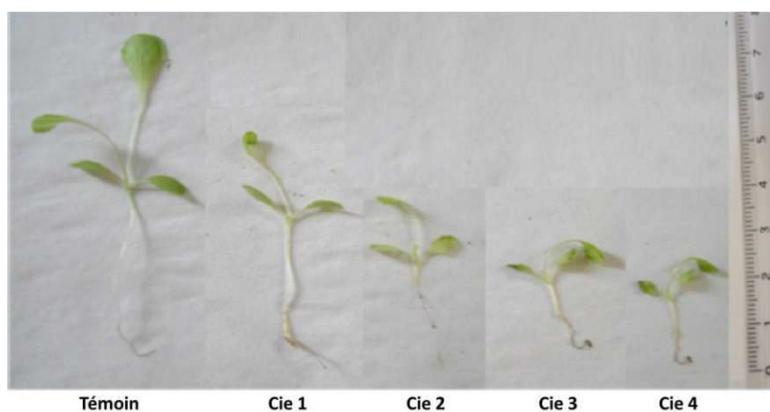


Figure I.17. Inhibition de la *croissance de plantules* de *L. sativa* exposées à 4 RITS industriels différents (Sancey, 2011).

Ils permettent aussi de souligner l'amélioration qualitative des effluents après un traitement chimique spécifique conventionnel (charbon actif, résine...) ou non conventionnel (amidon, cyclodextrine...)(Figures I.16 et I.17).

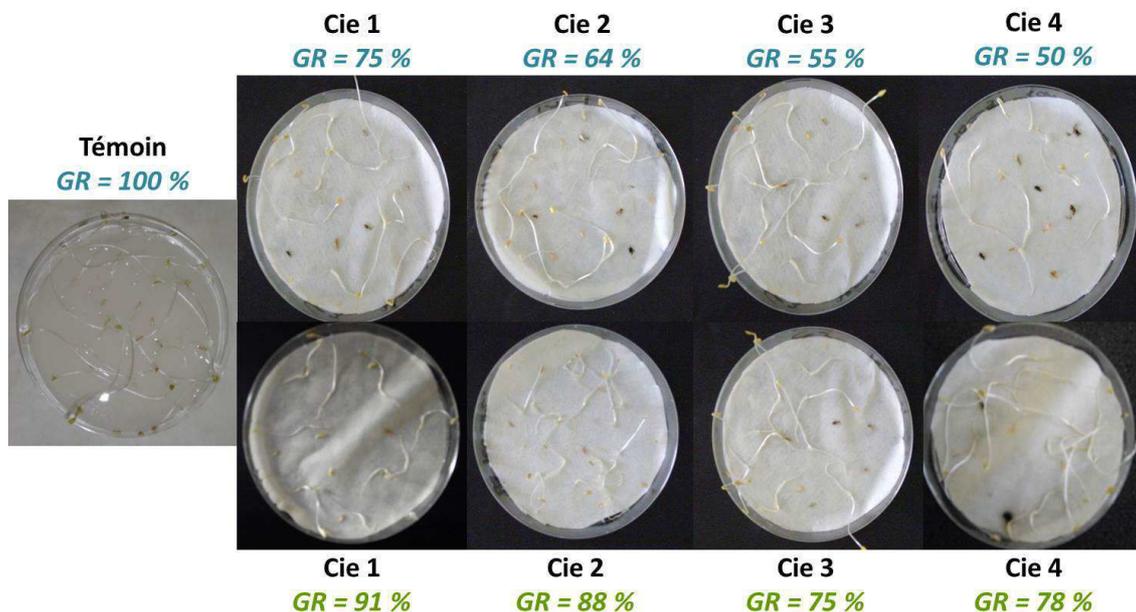


Figure I.18. Exemple d'amélioration qualitative des RITS après traitement physico-chimique sur la *germination* (ici *via* l'adjonction de cyclodextrine dans le rejet) (Sancey, 2011).

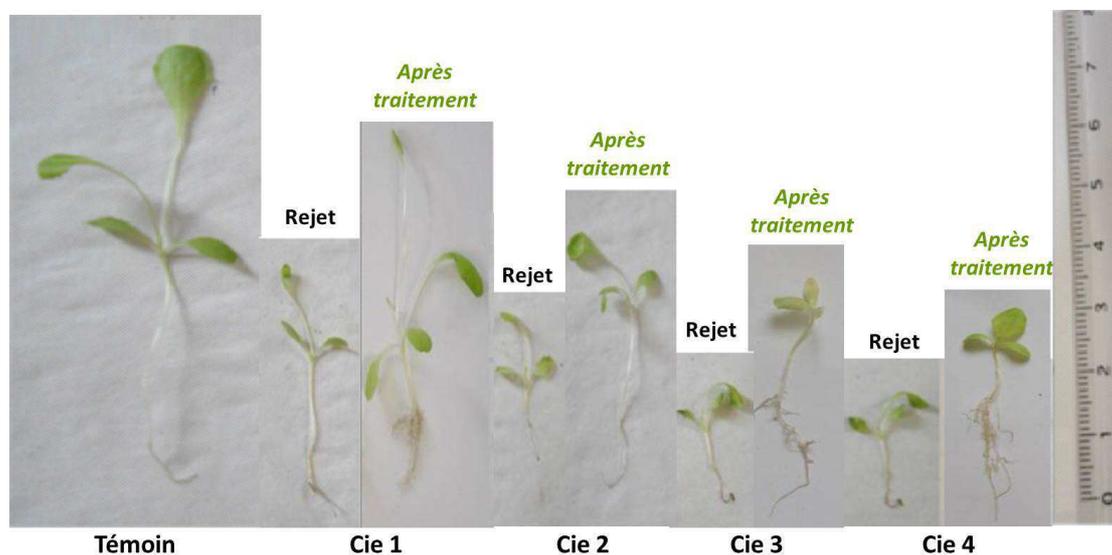


Figure I.19. Exemple d'amélioration qualitative des RITS après traitement physico-chimique sur la *croissance* (ici *via* l'adjonction de cyclodextrine dans le rejet) (Sancey, 2011).

3.3.1 Protocole du test de germination

Les tests de germination dont les résultats seront présentés dans ce manuscrit, répondent tous (sauf exceptions) au protocole suivant (Figure I.18). Trente semences¹ de laitue sont disposées dans une boîte de Pétri (100*15 mm), sur deux disques de papier filtre et arrosées de 4 mL de 1/ eau osmosée (témoin), ou 2/ rejet multicontaminé (dilué ou non ; pH compris entre 5,5 et 9,5), ou 3/ d'une solution synthétique mono- ou poly- contaminée. Chaque condition (témoin, rejet pur, rejet dilué) est testée en triplicat. Toutes les boîtes sont enfin disposées dans une chambre climatique (24 ± 1°C) à l'obscurité, pendant sept jours. A l'issue de ces sept jours, les plantules considérées "germées" sont comptabilisées² (cf. 3.3.2 Taux de germination) et mesurées (cf. 3.3.3 Elongations racinaire RL et totale TL). On note que le test est considéré valide si et seulement si le taux de germination des témoins est supérieur ou égal à 90 %.

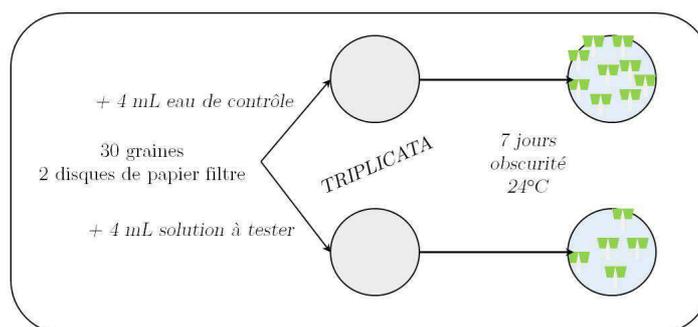


Figure I.20. Protocole du test de germination (Source : ISO 17126).

3.3.1.1 Taux de germination GR

A la fin du test de germination, les plantules "germées" sont comptées, ce qui permet le calcul d'un taux de germination (GR) selon l'équation suivante :

$$GR = \frac{GSS}{GSC} \times 100$$

où GSS est le nombre de semences germées pour l'échantillon testé (rejet pur ou dilué), et GSC est le nombre de semences germées pour le témoin (ou contrôle).

¹ Rondes, intactes et de taille homogène.

² Est considérée germée, une plantule d'au moins 3 mm de long, présentant une racine, une tige et deux cotyledons.

3.3.1.2 Courbe dose-réponse et CE_{50}

Ce léger abus de langage (cf. 2.2.2 Mesures d'écotoxicité) est justifié par l'utilisation généralisée de ce terme (*courbe dose-réponse*), qu'il s'agisse réellement d'une *dose* ou d'une *concentration* mesurée et exprimée en mg L^{-1} , en mg kg^{-1} ou en partie par million ppm (Berry & Wallace, 1981). L'élaboration d'une telle courbe (Figure I.19) est permise par l'utilisation de la matrice Excel RegTox (version 7.0.6). Les calculs des concentrations d'effet moyennes (ici l'effet est la germination) suivent un modèle de Hill.

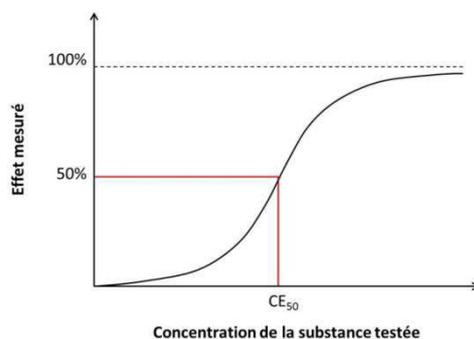


Figure I.21. Courbe dose (concentration) réponse type et CE_{50} .

3.3.1.3 Élongations Racinaire RL et Totale TL

L'élongation des plantules s'exprime en mm. Les plantules relativement fragiles sont à manipuler délicatement afin de les étendre le long d'une règle (Figure I.20) et mesurer les longueurs racinaire (RL) et totale (TL ; de l'extrémité de la racine à l'hypocotyle de la plantule).

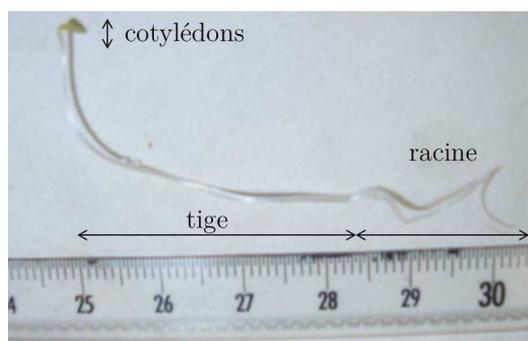


Figure I.22. Segments d'une plantule de laitue *L. sativa* (la plantule n'est pas étendue ici, pour les besoins de l'illustration photographique).

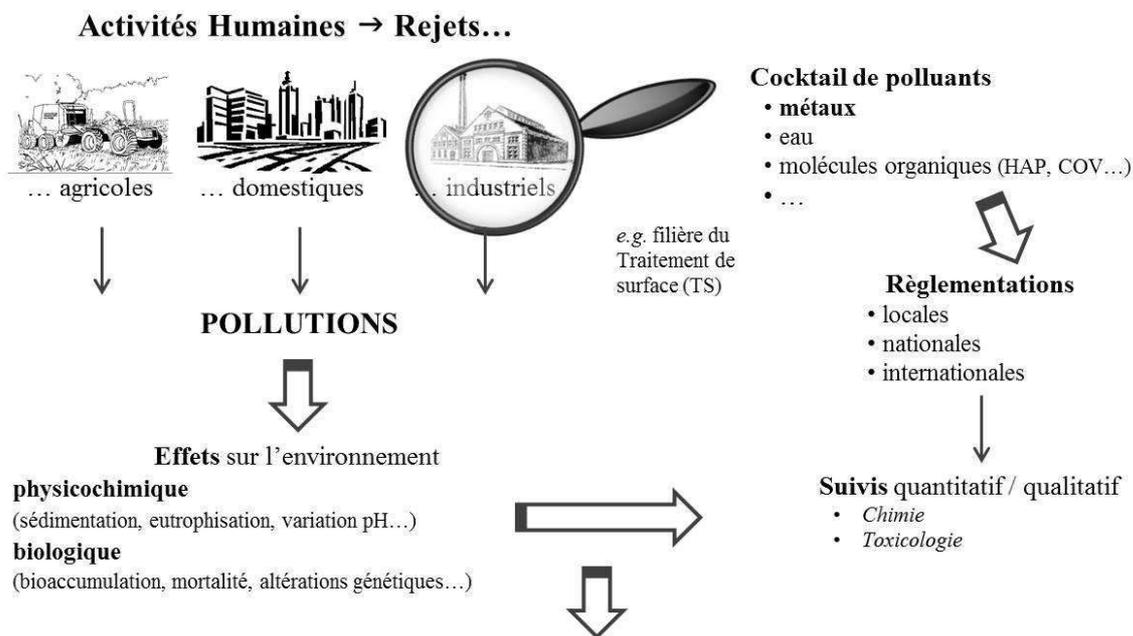
3.3.1.4 Indice de Germination GI

L'indice de germination GI a été utilisé afin de compléter les résultats et les interprétations des GR (Zucconi *et al.*, 1981, 1985 ; Alvarenga *et al.*, 2007 ; Varnero *et al.*, 2007). En effet, il permet de considérer des effets létaux (germination) et des effets sublétaux (élongation). L'équation de cet indice est la suivante :

$$GI = \frac{RLS \times GSS}{RLC \times GSC}$$

où GSS est le nombre de semences germées pour l'échantillon testé (rejet pur ou dilué), GSC est le nombre de semences germées pour le témoin (ou contrôle), RLS est la longueur racinaire pour l'échantillon testé (rejet pur ou dilué) et RLC est la longueur racinaire témoin.

BILAN DE LA SECTION I



ECOTOXICOLOGIE

“étude des effets délétères de produits polluants sur l'ensemble des êtres vivants d'un écosystème donné”
3 objectifs principaux

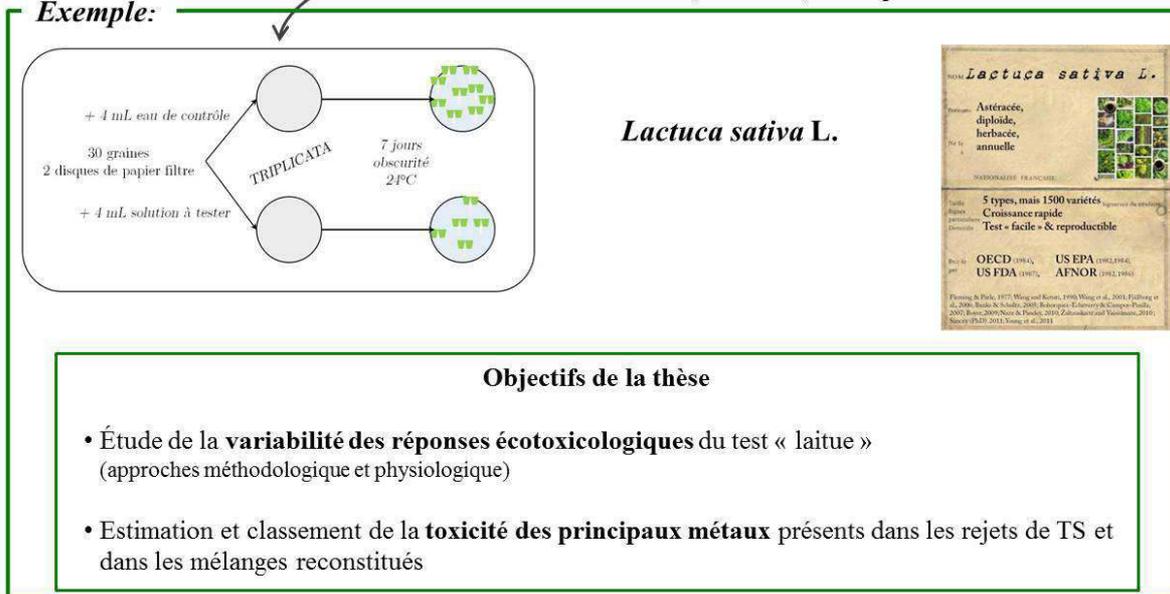
- définir l'écotoxicité d'une substance
- définir la probabilité d'exposition à cette substance
- développer des méthodes d'évaluation

COMMENT ?

→ **BIO-ESSAIS**

- rapide, sensible, reproductible...
- grande variété de bio- indicateurs, marqueurs
- animaux, végétaux, micro-organismes
- indices: létaux, sublétaux, chroniques

Exemple:



BIBLIOGRAPHIE

ARTICLES & OUVRAGES

- Adema DMM.** 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59:125-134.
- Adriano DC.** 1986. Trace Elements in Terrestrial Environment, Springer, New York, 871p.
- Alvarenga P, Palma P, Gonçalves A, Fernandes RM, Cunha-Queda A, Duarte E, Vallini G.** 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environ Int*, 33:505-513.
- Alvarenga P, Gonçalves A, Fernandes RM, De Varennes A, Vallini G, Duarte E, Cunha-Queda A.** 2007. Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *Sci Total Environ*, 406:43-56.
- Amiard JC.** 1990. Défense et illustration de l'écotoxicologie. *J Res Oceanogr*, 15:92-95.
- Amiard JC, Metayer C, Baud JP, Ribeyre F.** 1991. Influence de divers facteurs écologiques sur la bioaccumulation d'éléments métalliques (Cd, Cu, Pb, Zn) chez de jeunes palourdes (*Ruditapes philippinarum*) au cours du prégrossissement en nourricerie. *J Water Sci*, 4:441-452.
- Audoin L.** 1991. Rôle de l'azote et du phosphore dans la pollution animale. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 10:629-654.
- Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée & Corse,** 2010.
- Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L, Kizek R.** 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environ Chem Lett*, 6:189-213.
- Baker DE, Senft JP.** 1995. Copper. *In Heavy metals in soils.* Blackie Academic and Professional, London, 224-243.
- Bartha R, Ordal EJ.** 1965. Nickel-dependent chemolithotrophic growth of two hydrogenomonas strains. *J Bacteriol*, 89:1015-1019.
- Baurand PE, de Vaufleury A, Scheifler R, Capelli N.** 2013. Coupling of random amplified polymorphic DNA profiles analyses and high resolution capillary electrophoresis system for the assessment of chemical genotoxicity. *Environ Sci Technol*, 47:9505-9513.
- Berry WL, Wallace A.** 1981. Toxicity: the concept and relationship to the dose response curve. *J Plant Nutr*, 3:13-19.
- Biesinger KE, Christensen GM.** 1972. Effects of various metals on the survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *J Fish Res Bd Canada*, 29:1691-1700.
- Billard R.** 1989. Taxonomic change in rainbow trout scientific name: *Salmo gairdneri* becomes *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Living Res*, 2: 4.
- Bohorquez-Echeverry P, Campos-Pinilla C.** 2007. Assessment of *Lactuca sativa* and *Selenastrum capricornotum* like indicators of water toxicity. *Universitas Scientiarum*, 12:83-98.
- Boillot C.** 2008. Evaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l'amélioration de la phase « caractérisation des effets ». Thèse de Doctorat ès Sciences de l'Environnement Industriel et Urbain, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

- Boyer C. 2009.** Etude des transferts du tritium atmosphérique chez la laitue : étude cinétique, état d'équilibre et intégration du tritium sous forme organique lors d'une exposition atmosphérique continue. Thèse de Doctorat *ès Sciences de la Vie et de l'Environnement*, Université de Besançon.
- BREF. 2006.** Reference document on Best Available Techniques for the Surface Treatment of Metals and Plastics, EIPPCB Integrated Pollution Prevention and Control, European Commission, 544p.
- Brosse S, Grenouillet G, Gevrey M, Khazraie K, Tudesque L. 2011.** Small scale gold mining erodes fish assemblage structure in small Neotropical streams. *Biodivers Conserv*, 20:1013-1026.
- Brungs WA. 1973.** Effects of residual chlorine on aquatic life. *J Water Pollut Con F*, 45:2180-2193.
- Bryan GW. 1984.** Pollution due to heavy metals and their compounds. In *Marine Ecology: a comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters*. Kinne O (Ed.), John Wiley and Sons, New York, 1289-1431.
- Butler GC. 1978.** Principles of ecotoxicology. John Wiley and Sons, Toronto, 350p.
- Butler GC. 1984.** Developments in ecotoxicology. *Ecol Bull* 36:9-12.
- Cairns JJ, Pratt JR. 1989.** The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia*, 188/189:5-20.
- Cannon HL, Connally GG, Epstein JB, Parker JG, Thornton I, Wixson G. 1978.** Rocks: geological sources of most trace elements. *In Report to the workshop at south seas plantation, Captiva Island, Geochem Environ*, 3:17-31.
- Carson R. 1962.** Silent Spring. Houghton-Mifflin, Boston, 15p.
- Caurant F, Bustamante P, Bordes M, Miramand P. 1999.** Bioaccumulation of cadmium, copper and zinc in some tissues of three species of marine turtles stranded along the 73irsut Atlantic coasts. *Mar Pollut Bull*, 38:1085-1091.
- Chapman PF, Crane M, Wiles J, Noppert F, McIndoe E. 1996.** Improving the quality of statistics in regulatory ecotoxicity tests. *Ecotoxicology*, 5:169-186.
- Charles J. 2012.** Procédés physico-chimiques de décontamination et impact des rejets aqueux de la filière traitement de surfaces : Approches chimique et écotoxicologique. Thèse de Doctorat *ès Sciences de la Vie et de l'Environnement*, Université de Besançon.
- Chauvet M. 1985.** Les noms des Crucifères alimentaires à travers les langues européennes. Thèse de Doctorat *ès Linguistiques*, Université de Paris IV.
- Chauvet M. 1986.** L'histoire des légumes. *In La diversité des plantes légumières : Hier, aujourd'hui et demain*. Lavoisier, Paris, 9-21.
- Circulaire. 2002.** Circulaire du 4 février 2002 relative à l'action nationale de Recherche et réduction des rejets de Substances Dangereuses dans l'Eau par les installations classées. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Direction de la prévention des pollutions et des risques & Direction de l'Eau, Paris.
- Circulaire. 2009.** Circulaire du 5 janvier 2009 relative à la mise en œuvre de la deuxième phase d'action nationale de recherche et de réduction des substances dangereuses pour le milieu aquatique présentes dans les rejets des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) soumises à autorisation. Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire, Direction générale de la prévention des pollutions et des risques, Paris.

- Colaço A, Bustamante P, Fouquet Y, Sarradin PM, Serrão-Santos R.** 2006. Bioaccumulation of Hg, Cu and Zn in the Azores triple junction hydrothermal vent fields food web. *Chemosphere*, 65:2260-2267.
- CRAMIF.** 2010. Guide : Traitement de Surface – Substituer ou à défaut réduire et maîtriser l'exposition au chrome hexavalent. Caisse Régionale d'Assurance Maladie d'Ile de France, Paris, 48p.
- Crump KS.** 1984. A new method for determining allowable daily intakes. *Fundam Appl Toxicol*, 4:854-871.
- Currie LA.** 1999. Detection and quantification limits : origins and historical overview. *Anal Chim Acta*, 391:127-134.
- Denkhaus E, Salnikow K.** 2002. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit Rev Onco Hemat*, 42 :35-56.
- Diderot D, le Rond D'Alembert J.** 1779. *Encyclopédie ou Dictionnaire raisonné des Sciences, des Arts et des Métiers par une société de gens de lettres*. 3^{ème} Edition, Tome 19. Société Typographique, Neuchâtel. 1078p.
- Directive EC.** 1967. Directive 67/548/EEC of the European Parliament and of the Council of the 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, *Official Journal of the European Communities*, L 196/1, 16.08.1967, Brussels.
- Directive EC.** 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of the 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, *Official Journal of the European Communities*, L 327/2, 22.12.2000, Brussels.
- Directive EC.** 2006. Directive 2006/11/EC of the European Parliament and of the Council of the 15 February 2006 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community, *Official Journal of the European Communities*, L 64/52, 04.03.2006, Brussels.
- Duncan A.** 1821. XIII Additional observations on the use of lactucarium, or lettuce opium; particularly in a case of Cynanche Laryngea, or croup. *Philos Mag J¹*, 57:84-87.
- Edziri HL, Smach MA, Ammar S, Mahjoub MA, Mighri Z, Aouni M, Mastouri M.** 2011. Antioxidant, antibacterial, and antiviral effects of *Lactuca sativa* extracts. *Ind Crop Prod*, 34:1182-1185.
- EPA.** 1996. Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200): Seed germination, root elongation toxicity test, US Environmental Protection Agency; Office of Toxic Substances: Washington, D.C.
- Eshghi Malayeri B.** 1995. Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de plante et de microorganismes. Thèse de Doctorat ès Biologie des Organismes, Université de Nancy.
- Eskew DL, Welch RM, Cary EE.** 1983. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science*, 222:621-623.
- Eskew DL, Welch RM, Norvell WA.** 1984. Nickel in higher plants further evidence for an essential role. *Plant Physiol*, 76:691-693.

¹ The Philosophical Magazine and Journal: Comprehending the Various Branches of Science, The Liberal and Fine Arts, Geology, Agriculture, Manufactures, and Commerce.

- FDA.** 1987. Seed germination and root elongation. Environmental Assessment Technical Assistance. US Food and Drug Administration Department; of Health and Human Services: Washington, D.C.
- Fent K.** 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205 :223-240.
- Forbes VE, Forbes TL.** 1997. *Ecotoxicologie : théorie et applications*. Editions Quae, Paris, 256p.
- Fox DR, Billoir E, Charles S, Delignette-Muller ML, Lopes C.** 2012. What to do with NOECS/NOELS? Prohibition or innovation? *Integr Environ Assess Manag*, 8:764–6.
- Friberg L, Piscator M, Nordberg G, Kjellström T.** 1974. *Cadmium in the environment*. CRC Press, Cleveland, 248p.
- Gallo MA, Doull J.** 1991. History and scope of toxicology. *In* Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Klaassen CD, Amdur MO, Doull J (Eds.), Pergamon Press, New York City, 3-11.
- Gerendás J, Polacco JC, Freyermuth SK, Sattelmacher B.** 1999. Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J Plant Nutr Soil Sci*, 162:241-256.
- Glémarec M.** 1986. Ecological impact of an oil spill: utilization of biological indicators. *Water Sci Technol*, 18 :203-211.
- Goussen B.** 2013. Analyse par modélisation mécanistique des réponses microévolutive d'une population de *Caenorhabditis elegans* exposée à un stress métallique radioactive. Thèse de doctorat ès Sciences de l'Environnement, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- Gowland W.** 1899. XVI. The Early Metallurgy of Copper, Tin, and Iron in Europe, as illustrated by Ancient Remains, and the Primitive Processes surviving in Japan. *Archaeologia (Second Series)*, 56:267-322.
- Hänsch R, Mendel RR.** 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol*, 12:259-266.
- Harlan JR.** 1975. *Crops and man*. Amer Soc Agron, 295p.
- Haudricourt, Hédin L.** 1943. *L'homme et les plantes cultivées*. Gallimard, Paris, 235 p.
- Hayes WJ.** 1991. Dosage and other factors influencing toxicity. *In* Handbook of pesticide toxicology, General principles, vol. 1. WJ Hayes, ER Laws (Eds.), Academic Press, San Diego, 39-105.
- Hebert PDN & Ward RD.** 1972. Inheritance during parthenogenesis in *Daphnia magna*. *Genetics*, 71: 639-642.
- Herbert IN, Svendsen C, Hankard PK, Spurgeon DJ.** 2004. Comparison of instantaneous rate of population increase and critical-effect estimates in *Folsomia candida* exposed to four toxicants. *Ecotoxicol Environ Saf*, 57:175-183.
- Hernando MD, Fernandez-Alba AR, Tauler R, Barcelo D.** 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta*, 65:358-366.
- Hickey JJ, Anderson DW.** 1968. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science*, 162:271-3.
- Hoekstra JA, van Ewijk RH.** 1993. Alternatives for the no-observed effect level. *Environ Toxicol Chem*, 12:187-94.

- Holleman AF, Wiberg E.** 1985. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Walter de Gruyter, Berlin, 868p.
- Huang Z, Zhang X, Zheng G, Gutterman Y.** 2003. Influence of light, temperature, salinity and storage on seed germination of *Haloxylon ammodendron*. *J Arid Environ*, 55:453-464.
- ISO 6341.** 1989. Qualité de l'eau – Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Test de toxicité aigue.
- ISO 17126.** 2005. Qualité des sols – Détermination des effets des polluants sur la flore du sol – Essai de détection de l'émergence des plantules de laitue (*Lactuca sativa* L.), AFNOR ISO 17126 (in French).
- Jager T, Heugens EHW, Kooijman SALM.** 2006. Making sense of ecotoxicological test results : towards application of process-based models. *Ecotoxicology*, 15:305-314.
- Juste C, Chassin P, Gomez A, Linères M, Mocquot B, Feix I, Wiart J.** 1995. Les micropolluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. Collection Valorisation agricole des boues d'épuration, Connaître pour agir, Guides et Cahiers Techniques, ADEME, Angers, 209p.
- Kasuya M.** 2000. Recent epidemiological studies on itai-itai disease as a chronic cadmium poisoning in Japan. *Water Sci Tech*, 42:147-155.
- Klaassen CD, Eaton DL.** 1991. Principles of toxicology. *In* Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Klaassen CD, Amdur MO, Doull J (Eds.), Pergamon Press, New York City, 11-32.
- Klucas RV, Hanus FJ, Russell SA, Evans HJ.** 1983. Nickel: A micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. *Proc Natl Acad Sci*, 80:2253-2257.
- Kochian LV.** 1995. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plan Mol Biol*, 46:237-260.
- Kurland T, Faro SN, Siedler H.** 1960. Minamata disease. The outbreak of a neurologic disorder in Minamata, Japan, and its relationship to the ingestion of seafood contaminated by mercuric compounds. *World Neurology*, 1:370-395.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F.** 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : Aspects fondamentaux. Dunod, Paris, 419p.
- Laufer B.** 1919. Sino-Iranica. Chinese contributions to the history of civilization in Ancient Iran, with special reference to the history of cultivated plants and products. *Field Mus Nat Hist*, 15, Chicago.
- Lévêque R.** 2007. Traitement et revêtements de surface des métaux. Dunod Ed., Techniques et Ingénierie, 460p.
- Lipman CB, McKinney G.** 1931. Proof of the essential nature of copper for higher green plants. *Plant Physiol*, 6:539-599.
- Loureiro S, Soares AM, Nogueira AJ.** 2005. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environ Pollut*, 138:121-131.
- Mahmood T, Islam KR.** 2006. Response of rice seedlings to copper toxicity and acidity. *J Plant Nutr*, 29:943-957.

- Manzano R, Esteban E, Peñalosa, Alvarenga P.** 2014. Amendment application in a multi-contaminated mine soil : effects on soil enzymatic activities and ecotoxicological characteristics. *Environ Sci Pollut Res*, 21:4539-4550.
- Mazliak P.** 1974. *Physiologie végétale. Tome I : Nutrition et métabolisme.* Hermann, Paris, 578p.
- Mengel K, Kirkby EA.** 1987. Further elements of importance. *In Principles of Plant Nutrition*, fourth edition, International Potash Institute, Berne, 573-588.
- Mérat FV, de Lens AJ.** 1837. *Dictionnaire universel de matière médicale et de thérapeutique générale. Volume 4 (Vol. 4).* Société belge de librairie, Bruxelles. 522p.
- Merkens JC.** 1958. Studies on the toxicity of chlorine and chloramines to the rainbow trout. *Water Waste Treat J*, 7:150-151.
- Markert B.** 1993. *Plants as Biomonitors-Indicators of Heavy Metals in the Terrestrial Environment.* VCH Publishers, Germany. 644p.
- Moriarty F.** 1983. *Ecotoxicology: The Study of Pollutants in Ecosystems.* Academic Press, London, 228p.
- Moriarty F.** 1983. *Ecotoxicology: The Study of Pollutants in Ecosystems (Second edition).* Academic Press, London, 289p.
- Mortimer M, Kasemets K, Heinlaan M, Kurvet I, Kahru A.** 2008. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. *Toxicol in Vitro*, 22:1412-1417.
- Munch JC, Pratt HJ, Byers GE.** 1933. Lactucaria. I. The mydriatic activity of lactucaria by the Munch Methods. *J Am Pharm Assoc*, 22:943-946.
- Murkowki A, Skórska E.** 2008. Comparison of phytotoxicity of lead and tin organic compounds by means of luminescence methods. *Acta Agrophysica*, 11:131-140.
- Nielsen FH, Ollerich DA.** 1974. Nickel: a new essential element. *Fed Proc* 33:1767-1771.
- OECD.** 2003. *Terrestrial plant test ; Seedling emergence and growth test.* Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline 208, Paris.
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A.** 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot*, 52:199-223.
- Peakall DB.** 1970. DDT: Effect on calcium metabolism and concentration of estradiol in the blood. *Science*, 168:592-594.
- Plages JN.** 1986. Evolution et situation variétale actuelle chez la laitue. *In La diversité des plantes légumières : Hier, aujourd'hui et demain.* Lavoisier, Paris, 29-32.
- Ramade F.** 1977. *Ecotoxicologie.* Dunod, Paris, 205p.
- Ramade F.** 1989. *Les catastrophes écologiques.* Mc Graw Hill, New York City, 403p.
- Ramade F.** 1998. *Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau : biogéochimie et écologie des eaux continentales et littorales.* Dunod, Paris, 786p.
- Ramade F.** 2007. *Introduction à l'écotoxicologie : Fondements et applications.* Editions Lavoisier, Paris, 518p.
- Rand GM, Petrocelli SR.** 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology.* Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 666p.

- Ratcliffe DA.** 1970. Changes attributable to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some british birds. *J Appl Ecol*, 7:67-115.
- Regulation EC.** 2006. Regulation 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of the 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) n° 793/93 and Comission Regulation (EC) n° 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Comission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EEC and 2000/21/EC, Official Journal of the European Communities, L 304, 22.11.2007, Brussels.
- Reichman SM.** 2002. The responses of plants to metal toxicity: a review focusing on Copper, Manganese and Zinc. Australian Minerals & Energy Environment Foundation, Sydney, 55p.
- Renard HA.** 1986. La conservation des semences potagères. *In* La diversité des plantes légumières : Hier, aujourd'hui et demain. Lavoisier, Paris, 99-110.
- Renfrew C.** 1986. Varna and the emergence of wealth in prehistoric Europe. *In* The social life of things: commodities in cultural perspectives. Appadurai A. (Ed), Cambridge University Press, 141-168.
- Rochette R.** 1851. Mémoires sur les Jardins d'Adonis. *Rev Arch*, 1:97-123.
- Sancey B.** 2011. Développement de la bio-adsorption pour décontaminer des effluents de rejets industriels : Abatement chimique et gain environnemental. Thèse de Doctorat ès Sciences de la Vie et de l'Environnement, Université de Besançon.
- Seregin IV, Kozhevnikova AD.** 2005. Physiological role of nickel and its effects on higher plants. *Russ J Plant Physiol*, 53:257-277.
- Sherry JP, Scott BF, Nagy E, Dutka BJ.** 1994. Investingation of the sublethal effects of some petroleum refinery effluents. *J Aquat Ecosyst Health*, 3:129-137.
- Siedlecka A.** 1995. Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Soc Botanicorum Poloniae*, 64:265-272.
- Sigg L, Behra W, Stumm W.** 2014. Chimie des milieu aquatiques : Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. Dunod, Paris, 576p.
- Sipes IG, Gandolfi AJ.** 1986. Biotransformation of toxicants. *In* Toxicology: the basic science of poisons. Klaassen CD, Amdur MO, Doull J (Eds.), Pergamon Press, New York City, 88-126.
- Spurgeon DJ, Hopkins SP, Jones DT.** 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ Pollut*, 84:123-130.
- Sommer AL, Sorokin H.** 1928. Effects of absence of boron and of some other essential elements on the cell and tissue structure of the root tips of *Pisum sativum*. *Plant Physiol*, 3:237-260.
- Stalter D, Magdeburg A, Weil M, Knacker T, Oehlmann J.** 2010. Toxication or detoxication? In vitro toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Water Res*, 44:439-448.
- Tang T, Miller DM.** 1991. Growth and tissue composition of rice grown in soil treated with inorganic copper, nickel and arsenic. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 22:19-20.
- Thicoïpé JP.** 1997. Laitues. Editions CTIFL, Paris, 281p.
- Tremillon B.** 1993. Electrochimie analytique et reactions en solutions. Dunod, Paris, 518p.

- Truhaut R.** 1977. Ecotoxicology : objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1 :151-173.
- Vallee BL.** 1976. Zinc biochemistry : a perspective. *Trend Biochem Sci*, 1:88-91.
- Van Coillie R, Parent L.** 2011. *Ecotoxicologie générale et appliquée*. TELUQ, Québec, 521p.
- Varnero MT, Rojas C, Orellana R.** 2007. Phytotoxicity indices of organic residues during composting. *Soil Sci Plant Nut*, 7:28-37.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB.** 2006. *Principles of Ecotoxicology (Third Edition)*. CRC Press, Boca Raton, 315p.
- Welch RM.** 1981. The biological significance of nickel. *J Plant Nutr*, 3:345-356.
- Westerfield M.** 2000. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene, 200p.
- Woodwell GM.** 1974. The threshold problem in ecosystems. *In Ecosystem Analysis and Prediction*. Levin SA (Ed.), Society for Industrial and Applied Mathematics SIAM Conference, Alta, 9-21.
- Zeman F.** 2008. Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna*. Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange. Thèse de Doctorat *ès Evolution, Ecologie, Ressources génétiques, Paléontologie*, Université Montpellier II.
- Zohary D, Hopf M, Weiss E.** 2012. *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*, 4th Edition. Oxford University Press, Oxford, 264p.
- Zucconi F, Pera A, Forte M, de Bertoldi M.** 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle*, 22:54-57.
- Zucconi F, Monaco A, Forte M, de Bertoldi M.** 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. *In Composting of agricultural and other wastes*. Gasser JKR (Ed.), Elsevier, London, 73-85.

WEBOGRAPHIE

- Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques ONEMA.** www.eaufrance.fr
- Environnement Canada.** www.ec.gc.ca/mercure-mercure
- FAOStat.** 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Utilisé le 21-07-14. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>.
- International Center for Environmental Technology Transfer.** www.icett.or.jp/english/.
- Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse – Rapport METALDEX.**
http://www.eaurmc.fr/fileadmin/grands-dossiers/documents/Grands-dossiers-SubstancesDangereuses/METALDEX_Version_courte_septembre2012.pdf
- SESSI.** 2007. Service des Etudes et des Statistiques Industrielles de l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques INSEE. Utilisé le 21-07-2014.
<http://www.insee.fr/sessi/enquetes/eae/eae/285a.htm>.
- Standford University.**
http://web.stanford.edu/group/stanfordbirds/text/essays/DDT_and_Birds.html
- Ecole Normale Supérieure de Lyon.** www.ens-lyon.fr

II. METHODOLOGIE
TEST AVEC LACTUCA SATIVA

II.	Méthodologie Test avec <i>Lactuca sativa</i>	81
1	Variabilité des réponses écotoxicologiques Approche Méthodologique	84
1.1	Contexte	84
1.2	Article soumis à CRBiol	85
1.2.1	Introduction	86
1.2.2	Material and Methods	87
1.2.3	Results and Discussion	88
1.2.4	Conclusion	92
1.2.5	References	92
1.3	Conclusions & Perspectives	95
2	Variabilité des réponses écotoxicologiques Approche Physiologique	98
2.1	Contexte	98
2.2	Article en préparation	99
2.2.1	Introduction	100
2.2.2	Material and Methods	101
2.2.3	Results and Discussion	102
2.2.4	Conclusion	108
2.2.5	References	108
2.3	Conclusions & Perspectives	113
3	Étude Préliminaire I : Déchets Solides	115
3.1	Introduction	115
3.1.1	Contexte	115
3.1.2	Cendres & Procédés d'incinération	116
3.2	Matériel & Méthodes	117
3.2.1	Cendres	117
3.2.2	Semences	117

	83
3.2.3 Protocoles	117
3.2.4 Statistiques	118
3.3 Résultats	118
3.3.1 Germination	118
3.3.2 Elongation	121
3.3.3 Récapitulatif	124
3.4 Discussion & Conclusion	124
4 Étude Préliminaire II : Régénération	125
4.1 Contexte : quid des semences non germées ?	125
4.2 Matériel & Méthodes	125
4.2.1 Protocole	125
4.2.2 Rejet	126
4.2.3 Remarques	126
4.3 Résultats & Discussion	127
4.4 Conclusions & Perspectives	127
Bilan de la Section II	129
Bibliographie	130

TEST ÉCOTOXICOLOGIQUE LAITUE *LACTUCA SATIVA* (L.)

1 VARIABILITE DES REPONSES ECOTOXICOLOGIQUES APPROCHE METHODOLOGIQUE

1.1 Contexte

Comme mentionné précédemment, le test écotoxicologique “laitue” est couramment utilisé lors de l’évaluation de polluants. Ce contexte est un peu particulier dans la mesure où ces recherches ne sont *a priori* pas fondamentales. N’en déplaise aux puristes, ce sont bien des études d’écotoxicologie qui sont présentées ici. Travailler avec du matériel biologique en **dormance** peut sembler plus facile qu’avec du matériel biologique nécessitant des soins quotidiens (escargots, algues, daphnies, poissons...). C’est, en effet, plus simple, mais ne met pas à l’abri de problèmes techniques aussi triviaux que l’approvisionnement en matières premières, c’est-à-dire les semences. Ce qui ne devait être qu’un simple test de routine pour vérifier la conformité des résultats d’une variété disponible par rapport à une autre non disponible, a permis de mettre le doigt sur un problème plus important : la conformité au standard et l’importance de la variabilité des résultats en fonction de la variété choisie pour le test.

1.2 Article soumis à CRBioI¹

“Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa* : Focus on germination and root elongation test parameters”.

Authors : Anne Priac, Pierre-Marie Badot, Grégorio Crini.

Abstract :

Sensitive and simple ecotoxicological bioassays like seed germination and root elongation tests are commonly used to evaluate phytotoxicity of waste and industrial discharge waters. Although the tests are performed following national and international standards, various parameters such as the number of seeds per dish, test duration or type of support used remain variable. To be able to make a correct comparison of results from different studies, it is crucial to know which parameter(s) could affect ecotoxicological diagnosis. We tested four different control waters and three seed densities. No significant differences on either germination rate or root elongation endpoints were shown. Nevertheless, we found that the four lettuce cultivars (Appia, Batavia *dorée de printemps*, Grosse Blonde Paresseuse and Kinemontepas), showed significantly different responses when watered with the same and different metal-loaded industrial discharge water. From the comparison, it is clear that a differential sensitivity scale occurs among not just species but cultivars.

¹ Comptes Rendus Biologiques <http://www.journals.elsevier.com/comptes-rendus-biologies>

1.2.1 Introduction

Surface treatment (ST) is a very important industrial sector in Europe and in France, Franche-Comté is especially concerned. ST is well known to be one of the largest consumers of chemicals (toxic metals known to be harmful to humans and to the environment in particular) and water and to generate large amounts of toxic waste water with a complex composition [1]. Despite the efforts made to clean up their polycontaminated effluents, most commonly by physicochemical treatment [2], industry and scientists are confronted with a great challenge: to remove the entire load of organic and inorganic pollutants to assess their ecotoxicological effects and hence move towards zero pollution discharge [3,4]. While pollutant mixtures present in discharge water after treatment are relatively easy to characterize chemically, assessing their impact on the environment is usually difficult [2]: over the past few decades, ecotoxicological methods have been developed to complete chemical analysis [5].

Bioassays are widely carried out following national and international recommendations. Some very different organisms are commonly used in ecotoxicological bio-monitoring: primary producers (algae *i.e.*: *Pseudokirchneriella subcapitata* [6]), primary consumers (aquatic invertebrates *i.e.*: *Daphnia magna*, *Gammarus pulex* [7]) or secondary consumers (aquatic vertebrates *i.e.*: *Gambusia holbrooki* [8]). Less frequently used in comparison with faunal tests [9], toxicity studies using higher plants have however increased in recent years [11-12]. Ratsch [13] first concluded that the inhibition of root elongation is a valid and sensitive indicator of environmental toxicity. Several articles [10, 14-20] have since shown that phytotoxicity tests like seed

germination rate (GR) and root elongation (RE) tests present many advantages as summarized in Table II.1. These bioassays are simple, inexpensive and only require a relatively small amount of sample. Moreover, the seeds remain usable for a long time. The most common plant species recommended by, among others, the US Environmental Protection Agency [21], the US Food and Drug Administration [22] and the Organization for Economic Cooperation and Development [23] are cucumber *Cucumis sativus*, lettuce *Lactuca sativa* L., radish *Raphanus spp* L., red clover *Trifolium pratense* L. and wheat *Triticum aestivum*. Previous studies [20, 24] compared some of these species and recommended *L. sativa* as a bioindicator to determine the toxicity of soil and water samples.

Table II.1. Major advantages of phytotoxicity assays using vascular plant seeds.

Advantages of phytotoxicity tests involving seeds (seed germination rate, root elongation, <i>etc.</i>) ^a
<ul style="list-style-type: none">• Simple and very reproducible method• <i>Applicable in situ</i> and <i>in vitro</i>• No requirement for major equipment• Minimal maintenance costs• Seeds are self-sufficient (no adjuvants/nutrients needed in the test water)• Only small sample size required (<i>e.g.</i> water, effluent, soil, sediment)• No seasonality• Seeds can be easily purchased in bulk• Seeds remain viable a long time• Rapid germination

^a based on multiple references including [14, 15, 17, 10].

Haugland and Brandsaeter [25] previously studied the effects of various procedures and conditions on bioassay sensitivity in allelopathic studies. They pointed out that the lack of real standardized bioassays makes comparison between studies very difficult. It is

nowadays in fact the proceedings that are not standardized: even when phytotoxicological bioassays using lettuce are performed in accordance with national or international standards, multiple parameters remain variable (Table II.2). Di Salvatore [10], studying synthetic solutions containing metal ions, found that lettuce GR and RE were not affected by substrate, agar agar *vs* filter paper. However, there is no literature comparing the parameters used of industrial effluent, as that of the ST industry.

Table II.2. Non-exhaustive list of parameters that remain variable in seed germination bioassays.

Parameter	Examples
• Cultivar	• Regina; Buttercrunch; Trocadero; Divina; Iceberg; non-specified
• Support	• Agar agar; filter paper; germination paper; non-specified
• Seed pre-treatment	• Yes; no; non-specified – When yes: 10 or 30% hypochlorite solution
• Temperature [in °C]	• 20; 24; 28; room temperature; non-specified
• pH	• 5.5 to 8.2; non-specified
• Dish	• Glass; polyethylene; non-specified
• Number of seeds	• 10; 20; 50; non-specified
• Amount of sample	• 4 mL; 9 mL; non-specified
• Duration	• 72 to 192h
• Control water	• Distilled; deionized; milliQ; non-specified

^abased on multiple references including [1, 5, 10, 13, 19, 20, 26-30].

The present study is based on the assessment that proceeding parameters could affect ecotoxicity diagnosis. Indeed, we tested three of the most variable parameters, using germination rate, root and total lengths as end points: control

water quality, number of seeds per germination dish and lettuce cultivar.

1.2.2 Material and Methods

1.2.2.1 Industrial discharge water

During this study, discharge waters were once collected in 3 different surface treatment companies (denoted Co1, Co2 and Co3) in the Franche-Comté region. This industrial sector has to have a decontamination station before discharging effluent in the environment. Effluent samples were collected at the outlet of the decontamination station of each company. The main activities of each company and the related major environmental concerns are reported in Table II.3. The table also shows the concentration threshold in discharge for key pollutants. The effluents are average samples, characteristic of day's activity. Each treated water sample was tested following the same concentration range: 25, 50, 75 and 100%. All dilutions were prepared in Reverse Osmosis Water (ROW).

Table II.3. Main environmental issues encountered by the two surface treatment companies and the regulatory values (in mg L⁻¹) for different pollutants contained in the water discharges (French law of 5th September 2006).

Company and main activity	Contaminant(s) of major concern	Threshold emission value (mg L ⁻¹)
Co 1		
<i>Treatment by electrolysis</i>	Zn	3.5
	Ni	3.5
Co2		
<i>Plating with precious metals</i>	Fe	5
	Ni	2
Co3		
<i>Surface treatment of aluminum</i>	Al	5

1.2.2.2 Lettuce seeds

Four lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars were germinated: Appia (A), Batavia dorée de printemps (B), Grosse Blonde Paresseuse (GBP) and Kinemontepas (K). They were chosen among the 1500 or so commercially available cultivars. The seeds (Caillard, Avignon, France) were all kept under laboratory conditions, in the dark and shielded from large modifications of temperature and moisture [1].

1.2.2.3 Control and Toxicity tests

Germination rates for samples were evaluated using the French normalized method ISO 17126 [31]. Tests were conducted using 100*15mm disposable plastic Petri dishes and 2 layers of filter paper. Thirty plump undamaged seeds of almost identical size were laid on the filter paper in each dish, which contained 4 mL of industrial discharge water (pH~8.4). Each condition was tested in triplicate. All dishes were kept in the dark, at 24±1°C, for 7 days of exposure. A control test was performed in triplicate for every condition tested. Multiple parameters were tested as described in Table II.4. After seven days, germinated seeds were counted (GR) using equation 1 (where GSS is the number of Germinated Seeds in the Sample and GSC the number of Germinated Seeds in the Control) and plantlet growth measured (root and total lengths; RL and TL; total length refers to the root and hypocotyl of the plantlets).

$$GR = \frac{GSS}{GSC} \times 100 \quad (1)$$

As recommended by the standard, GR under 90% is unacceptable for control conditions. Control water pH did not skew germination test results as long as it remained between 5.5 and 9.5.

Table II.4. Parameters assessed here.

Quality of water	Distilled Water DW (pH 7.3)
	Mineral water Evian®, E (pH 7.2)
	Reverse osmosis Water ROW (pH 6)
	Ultra Pure Water UPW (pH 6.05)
Number of seeds per Petri dish	15
	20
	30
Cultivar of lettuce <i>Lactuca sativa</i>	var. Appia (A)
	var. Batavia dorée de printemps (B)
	var. Grosse Blonde Paresseuse (GBP)
	var. Kinemontepas (K)

1.2.2.4 Statistical analysis

All homoscedasticities were tested using a Bartlett test as prerequisite for parametric test. The germination rates were compared using the Chi² test and lengths (root and total) using Kruskal-Wallis tests, with a significance threshold of $p < 0.05$. All statistical analyses were performed with R (2.15.1) (R Development Core Team, 2013, www.r-project.org).

Dose-dependent curves and EC₅₀ values were calculated with Hill's model using the macro Excel Regtox free version EV 7.0.6.

Germination Index, GI, [32-35] were used to assess the response variability between lettuce cultivars. Calculations of these indexes were performed using the equations (2) where RLS is the Root Length of the Sample, RLC the Root Length of the Control.

$$GI = \frac{RLS \times GSS}{RLC \times GSC} \quad (2)$$

1.2.3 Results and Discussion

1.2.3.1 Control water

Four kinds of water (distilled, mineral, RO, and ultra pure) were used as controls.

Table II.5 reports the relative data of GR and RL of seeds watered with the different control waters. The assay was performed on the same cultivar of lettuce. The results showed that neither germination rate nor root length showed significant differences. For practical reasons, the control water chosen was reverse osmosis water ROW.

Table II.5. Comparison between germination rate GR and root length RL means (\pm SD; n=3) of *L. sativa* var Batavia dorée de printemps (B) watered with four different control waters (E, UPW, ROW, DW).

	E	UPW	ROW	DW	<i>P</i> <i>value</i>
GR (%)	100	99 ± 1.6	98 ± 3.1	94 ± 1.6	0.067
RL (mm)	14.28 ± 4.47	14.64 ± 5.99	17.80 ± 9.11	14.44 ± 5.79	0.147
TL (mm)	63.14 ± 4.20	61.33 ± 6.26	65.21 ± 6.18	67.73 ± 1.16	0.441

We synchronically tested the potential ecotoxicological differences between the four cultivars watered with ROW. Results (Table II.6) showed no statistical GR or RL differences between the different cultivars. Total lengths appeared to be different, especially Appia's total length from the 3 others. Differential cultivar total length was attributed intrinsic natural differences as far as root lengths were not significantly different.

Table II.6. Comparison between germination rate GR and root length RL means (\pm SD; n=3) of 4 lettuce cultivars watered with ROW.

	A	B	K	GBP	<i>P</i> <i>value</i>
GR (%)	95 ± 4.1	96 ± 2.9	93 ± 3.9	96 ± 3.4	0.357
RL (mm)	16.20 ± 5.40	25.70 ± 9.49	28.07 ± 8.16	24.49 ± 9.91	0.08
TL (mm)	57.49 ± 0.56	71.50 ± 4.55	81.05 ± 2.86	74.27 ± 15.02	0.02

1.2.3.2 Number of seeds per dish

Three seed densities (15, 20 and 30 seeds per dish) were tested, using the same lettuce cultivar (var. B). Results for the 3 bioassay endpoints are detailed in Table II.7. It can be seen that there was no significant difference between germination rate (100%; 95%; 98%) and both root (17.5; 18.5; 17.8 mm) and total (62; 71; 65.4 mm) length of the plantlet grown in dishes containing 15, 20 and 30 seeds respectively.

Table II.7. Number of seeds per Petri dish versus germination rate GR (%), root and total lengths RL and TL (mm) of *L. sativa* var B (n=3 replicates).

Number of seeds	GR (%)	RL (mm)	TL (mm)	<i>p</i> <i>value</i>
15	100	17.5 ± 8.5	62 ± 12.7	
20	95 ± 4	18.5 ± 5.75	71 ± 8.75	>0.05
30	98 ± 3	17.8 ± 9.1	65.4 ± 16.8	

Weidenhamer [36] reported that the number of seeds relative to the solution volume used in a seed germination bioassay was a factor in the results obtained as the amount of ferulic acid available to each seed influenced germination, rather than chemical concentration of the tested solution. It seems that there is not such a consensus about the effect of seed number on length: some report a correlation (*e.g.*: [37]) and some do not (*e.g.*: [38]). Our results show that for a 4 mL sample, seed number (15 to 30 seeds) did not affect either germination or elongation. For practical reasons, the number of seeds per dish was fixed at 20.

1.2.3.3 Seed cultivar

Bioassays were conducted using a sample of raw discharge water, taken from 3 different surface treatment companies (Co1S1, Co2S1 and Co3S1). The

characteristics of the samples are reported in [Table II.8](#).

Table II.8. Physicochemical characteristics of 3 discharge waters (Co1S1, Co2S1, Co3S1) from the 3 industrial sites investigated in this study (all concentrations are expressed in mg L^{-1} , except the conductivity in $\mu\text{S cm}^{-1}$).

Parameter / Metal	Co1S1	Co2S1	Co3S1
pH	8.5	8.4	6.9
Conductivity	-	1730	3280
Fe	1.97	5.18	0.117
Cr	0.13	0.079	0.12
Zn	2.67	0.15	0.05
Ni	0.6	0.96	0.49

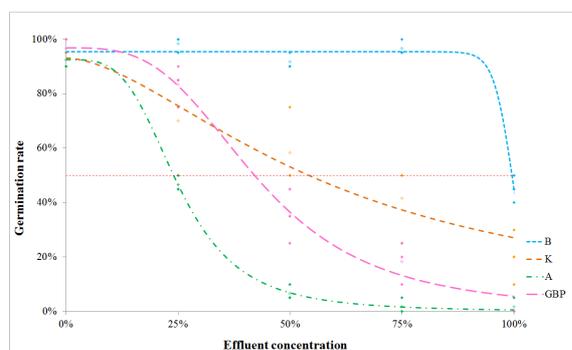


Fig. II.1. Lettuce germination rate versus concentration of Co1S1 raw discharge waters for the four lettuce varieties (Batavia B, Kinemontepas K, Appia A and Grosse Blonde Paresseuse GBP).

[Figure 1](#) shows the 4 different dose-response curves of the 4 lettuce cultivars watered with Co1S1. It can be seen that when watered with the same effluent sample, the 4 cultivars did not show the same ecotoxicological response. This was confirmed by the results described in [Table II.9](#) which presents GR and GI of every

diluted sample assessed on the 4 lettuce cultivars, and EC_{50} of every sample. GR decreased with all the four raw samples. The intensity of the decrease depends on the sample (*e.g.*: var B's germination rate varied from 45 ± 4.1 to 93 ± 2.4 %). Indeed, Charles *et al.* [1] showed that lettuce ecotoxicological response variability can be linked with the chemical composition of the samples, which varies on a daily basis ([Table II.8](#)). Differences between GRs were significant: for example, values for undiluted Co1S1 were $2 \pm 2.4\%$, $45 \pm 4.1\%$, 0% and $20 \pm 8.2\%$ for var A, var B, var GBP and var K, respectively ([Fig. 1](#)). The same observation was made considering all the tested samples and EC_{50} s ([Table II.8](#)). After comparing GR and EC_{50} values, var A was found to be the most sensitive cultivar, vars K and GBP medium, and var B the most resistant to the three effluents tested. This was confirmed by comparing GRs/ EC_{50} s sensitive scale with Gis sensitive scale.

Although germination rate (lethal endpoint) is the most commonly used endpoint, it is not the most sensitive [39]: root length (sublethal endpoint) has often proved to be a more sensitive parameter but not as easy to measure as germination. This is the reason why GI, first defined to assess compost toxicity [32], combines advantageously relative seed germination and root elongation measurements, generating an objective sensitivity scale, here: $B > K > \text{GBP} > A$, where the Appia cultivar is the most sensitive of the four.

Table II.9. Germination rate, EC₅₀ and germination index values for the four lettuce cultivars watered with the four effluent samples.

	Sample	Lettuce cultivar	Treatment (tested effluent concentration)				EC ₅₀	Sensitivity Scale
			25%	50%	75%	100%		
Germination Rate GR [%]	Co1S1	B	98 ± 2.4	92 ± 2.4	97 ± 2.4	45 ± 4.1	99.75	B>K>GBP>A
		K	70 ± 14.7	58 ± 11.8	42 ± 11.8	20 ± 8.2	59.15	
		A	47 ± 2.4	7 ± 2.4	2 ± 2.4	2 ± 2.4	25.11	
		GBP	83 ± 6.2	35 ± 8.2	18 ± 6.2	0	42.93	
	Co2S1	B	73 ± 2.4	93 ± 2.4	87 ± 6.2	77 ± 14.3	n.a.	B~K~GBP>A
		K	95	92 ± 5	92 ± 2.5	87 ± 2.5	n.a.	
		A	82 ± 8.5	52 ± 14.3	33 ± 6.2	28 ± 14.3	61.17	
		GBP	97 ± 4.7	97 ± 6.2	97 ± 4.7	68 ± 6.2	n.a.	
	Co3S1	B	98 ± 2.4	90 ± 4.1	88 ± 2.4	85 ± 4.1	n.a.	B~K>GBP>A
		K	97 ± 4.7	100	98 ± 2.4	92 ± 2.4	n.a.	
		A	93 ± 2.4	82 ± 6.2	67 ± 6.2	35 ± 4.1	90.01	
		GBP	100	98 ± 2.4	88 ± 2.4	72 ± 4.7	n.a.	
Germination Index GI	Co1S1	B	1.5	1.45	1.42	0.4	B>>K>GBP>A	
		K	0.96	0.67	0.33	0.13		
		A	1.12	0.13	0.03	0.05		
		GBP	0.89	0.51	0.23	0		
	Co2S1	B	1.21	1.16	1.42	1.18	B>GBP~K >A	
		K	0.73	0.98	1.01	0.98		
		A	1.23	0.74	0.59	0.32		
		GBP	1.21	1.16	1.13	0.85		
	Co3S1	B	1.01	0.77	0.70	0.53	B~GBP>K>>A	
		K	1.04	0.88	0.7	0.56		
		A	0.49	0.42	0.32	0.23		
		GBP	1.32	0.92	0.68	0.49		

Toxicity and ecotoxicity depend on the bioassay indicator and the endpoints considered [40]. Differences in sensitivity of plant *species* to various pollutants have been demonstrated [10, 41-43]. Wang and Freemark [17] reviewed and concluded that sensitivity varies among toxicants and taxonomic *groups* and *species*. Bio-indicator variety's choice has already been showed for specie like potatoe (Mench, 1993; Gravouille, 1999) or wheat (Clarke *et al.*, 1997; Raimbault, 2001). Beside the risk of toxicity underestimation when only one bioassay is used [44], Cairns and Pratt [45] concluded that the potential difference in results from one species to another may affect the extrapolation accuracy.

1.2.4 Conclusion

This study demonstrated that among multiple variable germination and elongation test proceeding parameters, control water quality and seeds density did not affect neither lettuce germination rate nor root or total lengths. However, when sensitivity differences among species are well known, it appears that cultivar has a major effect in the assessment of discharge water toxicity: we suggest to carefully choose the bioindicator cultivar, and may be proceeding rapid tests among multiple cultivar. It would be interesting in further investigations to determine which physiological phenomena (*e.g.* metal uptake) are different, and can explain ecotoxicological differences observed.

Acknowledgements

The authors are grateful to Besançon City Council which funded Anne Priac's PhD, to Sophie Gavaille and Céline Lagarrigue from the Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse, and to the FEDER (*Fonds Européens de Développement Régional*) for financial support (NIRHOFEX Program 2013-2017). Michael Coeurdassier and Peter Winterton are thanked

for critical discussions, and Coline Druart, Philippe Antoine, Xavier Hutinet and Jocelyn Paillet for technical assistance.

1.2.5 References

- [1]. J. Charles, B. Sancey, N. Morin-Crini, P.M. Badot, F. Degiorgi, G. Trunfio, G. Crini G, Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (2011) 2057-2064.
- [2]. B. Sancey, G. Trunfio, J. Charles, P.M. Badot, G. Crini, Sorption onto crosslinked cyclodextrin polymers for industrial pollutants removal: an interesting environmental approach, *J. Incl. Phenom. Macro.* 70 (2011) 315-320.
- [3]. E.C. Directive, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of the 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, *Official Journal of the European Communities*, L 327/2, 22.12.2000, Brussels, 2000.
- [4]. E.C. Directive, Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of the 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and Council, *Official Journal of the European Communities*, L 348/84, 24.12.2008, Brussels, 2008.
- [5]. B. Fjällborg, B. Li, E. Nilsson, G. Dave, Toxicity identification evaluation of five metals performed with two organisms (*Daphnia magna* and *Lactuca sativa*), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50 (2006) 196-204.
- [6]. P. Radix, M. Léonard, C. Papantoniou, G. Roman, E. Saouter, S. Gallotti-Schmitt, H. Thiébaud, P. Vasseur, Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47 (2000) 186-194.

- [7]. J. Charles, G. Crini, F. Degiorgi, B. Sancey, N. Morin-Crini, P.M. Badot, Unexpected toxic interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) exposed to binary copper and nickel mixtures, *Environ. Sci. Pollut. R.* 21 (2014) 1099-1111.
- [8]. V. Drèze, G. Monod, J.P. Cravedi, S. Biagiante-Risbourg, F. Le Gac, Effects of 4-nonylphenol on sex differentiation and puberty in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*), *Ecotoxicology* 9 (2000) 93-103.
- [9]. M.A. Lewis, Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review, *Environ. Pollut.* 87 (1995) 319-336.
- [10]. M. Di Salvatore, A.M. Carafa, G. Carratù, Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates, *Chemosphere* 73 (2008) 1461-1646.
- [11]. G. Uzu, S. Sobanska, G. Sarret, M. Munoz, C. Dumat, Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 1036-1042.
- [12]. L. Rizzo, Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment, *Water Res.* 45 (2011) 4311-4340.
- [13]. H.C. Ratsch, D. Johndro, Comparative toxicity of six test chemicals to lettuce using two root elongation test methods, *Environ. Monit. Assess.* 6 (1984) 267-276.
- [14]. A.M. Mayer, A. Poljakoff-Mayber, The germination of seeds, 4th Edition, Pergamon Press, New-York, 1989.
- [15]. B.J. Dutka, Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments, National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada, 1989.
- [16]. W. Wang, Literature review on higher plants for toxicity testing, *Water, Air, Soil Pollut.* 59 (1991) 381-400.
- [17]. W. Wang, K. Freemark, The use of plants for environmental monitoring and assessment, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30 (1995) 289-301.
- [18]. K.E. Gustavson, S.A. Sonsthagen, R.A. Crunkilton, J.M. Harkin, Ground water toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analysis, *Environ. Toxicol.* 15 (2000) 421-430.
- [19]. X.D. Wang, C. Sun, S. Gao, L. Wang, H. Shuokui, Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*, *Chemosphere* 44 (2001) 1711-1721.
- [20]. M.K. Banks, K.E. Schultz, Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soil, *Water, Air, Soil Pollut.* 167 (2005) 211-219.
- [21]. E.P.A., Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200): Seed germination, root elongation toxicity test, US Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances: Washington, D.C., 1996
- [22]. F.D.A., Seed germination and root elongation, Environmental Assessment Technical Assistance, US Food and Drug Administration Department of Health and Human Services: Washington, D.C., 1987
- [23]. O.E.C.D., Terrestrial plant test ; Seedling emergence and growth test, Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline 208, Paris, 2003.
- [24]. W. Wang, Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants, *Environ. Toxicol. Chem.* 6 (1987) 409-414.
- [25]. E. Haugland, L.D. Brandsaeter, Experiments on bioassay sensitivity in the study of allelopathy, *J. Chem. Ecol.* 22 (1996) 1845-1859.
- [26]. W. Wang, P.H. Keturi, Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample, *Water, Air, Soil Pollut.* 52 (1990) 369-376.
- [27]. M. Kummerová, E. Kmentová, Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling, *Chemosphere* 56 (2004) 387-393.
- [28]. B. Fjällbörg, N. Gustafsson, Short-term bioassay responses to sludge products and leachate. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (2006) 367-376.
- [29]. L.F. Andrade, L.C. Davide, L.S. Gedraite, The effects of cyanide compounds, fluorides,

- aluminium, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (2010) 626-631.
- [30]. E. Schreck, C. Laplanche, M. Le Guédard, J.J. Bessoule, A. Austruy, T. Xiong, Y. Foucault, C. Dumat, Influence of fine process particles enriched with metals and metalloids on *Lactuca sativa* L. leaf fatty acid composition following air and/or soil plant field exposure. *Environ. Pollut.* 179 (2013) 242-249.
- [31]. A.F.N.O.R., Qualité des sols – Détermination des effets des polluants sur la flore du sol – Essai de détection de l'émergence des plantules de laitue (*Lactuca sativa* L.), A.F.N.O.R. ISO 17126 (in French), 2005.
- [32]. F. Zucconi, A. Pera, M. Forte, M. de Bertoldi, Evaluating toxicity of immature compost, *Biocycle* 22 (1981) 54-57.
- [33]. F. Zucconi, A. Monaco, M. Forte, M. de Bertoldi, Phytotoxins during the stabilization of organic matter, in: J.K.R. Gasser (Ed.), *Composting of agricultural and other wastes*, Elsevier, London, 1985, pp. 73-85.
- [34]. P. Alvarenga, P. Palma, A. Gonçalves, R. Fernandes, A. Cunha-Queda, E. Duarte, G. Vallini, Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land, *Environ. Int.* 33 (2007) 505-513.
- [35]. M.T. Varnero, C. Rojas, R. Orellana, Phytotoxicity indices of organic residues during composting, *Soil Sci. Plant Nut.* 7 (2007) 28-37.
- [36]. J.D. Weidenhamer, T.C. Morton, J.T. Romeo, Solution volume and seed number: often overlooked factors in allelopathic bioassays, *J. Chem. Ecol.* 13 (1987) 1481-1491.
- [37]. G. Woodward, B. Ebenman, M. Emmerson, J.M. Montoya, J.M. Olesen, A. Valido, P.H. Warren, Body size in ecological networks, *Trends Ecol. Evol.* 20 (2005) 402-409.
- [38]. E.P. White, S.K.M. Ernest, A.J. Kerkhoff, B.J. Enquist, Relationships between body size and abundance in ecology, *Trends Ecol. Evol.* 22 (2007) 323-330.
- [39]. G.R. Leather, F.A. Einhellig, Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity, *J. Chem. Ecol.* 14 (1988) 1821-1828.
- [40]. S.A. Wangberg, B. Bergström, H. Blanck, O. Svanberg, The relative sensitivity and sensitivity patterns of short-term toxicity tests applied to industrial waste water, *Environ. Toxicol. And Water Quality* 10 (1995) 81-90.
- [41]. W.E. Miller, S.A. Peterson, J.C. Greene, C.A. Callahan, Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites, *J. Environ. Qual.* 14 (1985) 569-574.
- [42]. J.M. Thomas, J.R. Skalski, J.F. Cline, M.C. McShane, J.C. Simpson, W.E. Miller, S.A. Peterson, C.A. Callahan, J.C. Greene, Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extend using bioassays, *Environ. Toxicol. Chem.* 5 (1986) 487-501.
- [43]. J.S. Fletcher, F.L. Johnson, J.C. McFarlane JC, Database assessment of phytotoxicity data published on terrestrial vascular plants, *Environ. Toxicol. Chem.* 7 (1988) 615-622.
- [44]. M.D. Hernando, A.R. Fernandez-Alba, R. Tauler, D. Barcelo, Toxicity assays applied to wastewater treatment, *Talanta* 65 (2005) 358-366.
- [45]. J.J. Cairns, J.R. Pratt, The scientific basis of bioassays, *Hydrobiologia* 188/189 (1989) 5-20.

1.3 Conclusions & Perspectives

Il est donc connu et reconnu que le “test laitue” est un outil entre autres simple et rapide (Tableau II.1) pour évaluer l’écotoxicité potentielle de solutions synthétiques (Di Salvatore *et al.*, 2008 ; Section III, Chapitre 2), et/ou la qualité d’un rejet industriel et ses effets sur l’environnement (Charles *et al.*, 2011 ; Section II, Chapitre 1). Néanmoins, les indices d’écotoxicité ne sont pas une réponse absolue aux questions environnementales que l’on se pose (Libralato *et al.*, 2010) : différents facteurs peuvent influencer la sensibilité, et donc les réponses d’un bio-essai (Tableau II.10).

Tableau II.10. Facteurs d’influence sur la sensibilité des bio-essais.

Paramètre / Facteur	Référence(s)
Forme du produit (<i>e.g.</i> ETM)	Brungs, 1973 ; Patra <i>et al.</i> , 2004
Domaine (Animal, Végétal, Bactérien)	Repetto <i>et al.</i> , 2001 ; Pandard <i>et al.</i> , 2006 ; Pablos <i>et al.</i> , 2009 ; Section III, Chapitre 2
Groupe, Espèce	Sloff <i>et al.</i> , 1983 ; Blanck, 1984 ; Miller <i>et al.</i> , 1985 ; Wang & Freemark ; Di Salvatore <i>et al.</i> , 2008 ; Libralato <i>et al.</i> , 2010
Niveau Trophique	Dutka <i>et al.</i> , 1989 ; Ramos <i>et al.</i> , 2009 ; Carravieri <i>et al.</i> , 2014
Âge	Malinga <i>et al.</i> , 2010 ; Blévin <i>et al.</i> , 2014
Sexe	Ramos <i>et al.</i> , 2009 ; Barrera-Garcia <i>et al.</i> , 2012
Potentiel osmotique	Haugland & Bransaeter, 1996
Endpoint	Wangberg <i>et al.</i> , 1995

Dans cette étude, il apparaît que, parmi les facteurs d’influence du test, on peut aussi compter la variété (cultivar) du bio-indicateur, et les classer de la plus à la moins sensible : Appia, Grosse Blonde Paresseuse et Kinemontepas¹, Batavia. Si John et van Laerhoven (1970) ont mis en évidence des effets différentiels du Cd sur six variétés de laitues différentes, on notera que les protocoles étaient différents dans la mesure où ce sont des RITS qui ont été évalués lors de tests de germination quand John et van Laerhoven réalisaient des tests de croissance sur des solutions synthétiques avec ajout de solution nutritive. Nos quatre variétés appartenant au même groupe (Pommées), il serait intéressant pour ne pas dire pertinent ou nécessaire de multiplier les tests

¹ La GBP et la Kinemontepas sont deux variétés visiblement moyennes dans la mesure où en fonction de la composition du RITS testé, l’une peut être plus sensible que l’autre et *vice versa*.

variétaux (inter- et intra- groupes) afin d'obtenir un classement de sensibilité plus étoffé (*e.g.* Semenzin *et al.*, 2007). En effet, comme synthétisé dans le [Tableau I.7](#), les réponses écotoxicologiques individuelles (nécrose, chlorose, diminution de la croissance...) sont le reflet d'atteintes physiologiques profondes (respiration cellulaire, photosynthèse, synthèse protéique, transport ionique...).

Relevons également qu'aucun effet de la densité spatiale des semences sur les différents endpoints mesurés (taux de germination, longueurs racinaire et totale) n'a été relevé, contrairement à ce qu'ont démontré Weidenhamer et ses collaborateurs (1987) en traitant des semences de *concombre* dans différentes conditions. Il serait d'ailleurs intéressant d'estimer la variabilité des réponses écotoxicologiques d'espèces végétales également très utilisées dans des bio-essais, comme le concombre, la tomate, le soja, le blé *etc.* (Di Salvatore *et al.*, 2008). Comme précisé dans l'article (*cf.* 1.2.3.2. *Number of seeds per dish*), les relations entre la taille et l'abondance ne font pas encore l'objet d'un consensus (Guo *et al.*, 2000 ; Woodward *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2007).

Pour l'heure, il semble incontournable d'expliquer, ou tout du moins de tenter, ces différentes écotoxicologiques d'un point de vue plus physiologique.

Si les pollutions anthropiques sont des maladies et les biotests sont les examens que l'on fait passer au patient, les réponses écotoxicologiques sont les symptômes de cette maladie. Comme pour toute maladie, pour la guérir et surtout la prévenir, il ne faut pas se contenter de supprimer les symptômes : c'est une résolution temporaire. Il convient de connaître le maximum de tenants pour comprendre les aboutissants. Ainsi, pour tenter d'expliquer les différences de réponses des variétés de laitues, il est indispensable de zoomer et de prendre un point de vue plus physiologique.

2 VARIABILITE DES REPONSES ECOTOXICOLOGIQUES APPROCHE PHYSIOLOGIQUE

2.1 Contexte

La sensibilité des variétés de laitues testées a été ordonnée, la Batavia étant toujours la plus résistante aux RITS, l'Appia la plus sensible. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de ne garder que ces deux variétés pour opérer des dosages. La Kinemontepas et la Grosse Blonde Paresseuse étaient trop "moyennes" et interchangeables, le risque d'obtenir des résultats "moyens" et très difficilement interprétables, était trop grand.

Les produits testés sont à nouveau des RITS, principalement composées d'ETMs. Le protocole de germination a été légèrement modifié pour satisfaire aux exigences techniques de l'ICP, qui nécessite une certaine masse d'échantillon pour procéder aux analyses : ainsi, chaque condition (témoin ; rejet dilué, rejet pur) a été testée non pas en triplicata mais en triple triplicata.

2.2 Article en préparation

“Differential uptake of trace element in two *Lactuca sativa* varieties”.

Authors : Anne Priac, Nadia Morin-Crini, Badr Alaoui-Sossé, Grégorio Crini.

Abstract :

The lettuce *Lactuca sativa* L. is one among the most recommended higher plants for ecotoxicological bioassays. Previous studies have shown that some parameters do not have impacts on ecotoxicological results (*e.g.* growth substrate, seed Petri dish density...). However, it also had been shown that lettuce variety has impacts ecotoxicological results (*e.g.* germination rate, elongation...). Pursuing these works, we watered two different lettuce seed varieties (Appia and Batavia dorée de printemps) with raw and diluted (25, 50 and 75%) surface treatment polycontaminated discharged water, which are really complex mixtures and anthropogenic source of organic molecules, mineral elements, salts, and metal ions. Effluents, seeds and plantlets were analyzed by ICP-AES spectrometry. Metallic pollution is known to be an important stress, affecting plant growth, photosynthesis, phytoaccumulation efficiency *etc.*, and represents energy expenses for the plant. This comparative study combined ecotoxicological, chemical and physiological assessments: (i) germination rate results confirmed intraspecific sensitivity differences, Appia being more sensitive to discharge water pollutants than Batavia; (ii) seed chemical analysis showed significative Na, Ni and Cd inner composition differences between the two varieties; (iii) plantlets analyses seemed to define two different metal uptake patterns. Considering ecotoxicological bioassays, and their importance in environmental assessments, variety's choice should be more considered as crucial parameter and at least mentioned in published studies.

Remarque :

Dans le texte Priac *et al.*, submitted se réfère à l'article présenté dans le chapitre 1 de la Section II (p 84)

2.2.1 Introduction

In regions where water shortage represents a serious problem, but also in subtropical and temperate areas (Barton *et al.*, 2005; Bixio *et al.*, 2006), wastewater is more and more used to irrigate farming fields (fruits trees, cotton, vineyards, cereals,...) and also leisure places as golf courses or public gardens (Bahri & Brissaud, 1996). Even used under strict sanitary criteria (Toze, 2006), wastewater, sludge and other nonconventional source of water or amendment reuse are thus becoming important ecological and ecotoxicological issues (Renoux *et al.*, 2001; Katz *et al.*, 2009), encouraged by the endless increasing urbanization (Ben Fredj *et al.*, 2014). Industrial discharge water (DW), especially those generated by surface treatment (ST) industries, although usually respecting regulatory standards, releases into the aquatic ecosystems various loads of hazardous substances including: metallic trace elements (MTE), organic matter as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and volatile organic compounds (VOCs) (Charles *et al.* 2011; Morin-Crini *et al.* 2013). Relatively easily assimilated by organisms, metals lead to long term toxic effects on the environment (Komjarova and Blust 2009; Charles *et al.* 2011).

Laboratory tests assessing DW ecotoxicological risks and effects are numerous, using animal, vegetal and microbial indicators (Ratsch & Johndro, 1984; Wang & Freemark, 1995; Bierkens *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2000; Alvarenga *et al.*, 2007; Benzarti *et al.*, 2008; Cairns & Pratt 1989; Bascombe *et al.* 1990; Farré & Barcelo 2003; Pandard *et al.* 2006; Charles *et al.* 2014). Nevertheless, it was pointed out that toxicity assessment strongly relies on the choice of bioindicators and the endpoints used in the bioassays (Wangberg

et al. 1995; Beauregard & Ridal, 2000; Libralato *et al.* 2010; Priac *et al.* submitted) since sensitivity varies among taxonomic groups and species (Codina *et al.*, 1993; Ribo, 1997; Shoji *et al.*, 2000; Miller *et al.* 1985; Wang & Freemark 1995; Di Salvatore *et al.* 2008). For several years our research group has used biomonitoring tests with animals (*Daphnia magna*, *Gammarus pulex*) or plants (*Lactuca sativa*) to assess ST effluents toxicity: to our knowledge, little scientific research has been done on the actual environmental impact of DW from this industrial sector (Schüürmann & Market 1998; Backhaus *et al.* 2003; Sancey *et al.* 2011; Kadirova *et al.* 2014).

Lettuce *Lactuca sativa* (L.) deserve particular attention as it is one of the most cultivated crop specie (25 million tons produced in 2012; FAO, 2014) and also is recommended for ecotoxicological bioassays (EPA, 1996; FDA, 1987; OECD, 2003), among wheat, tomato or cucumber (Wang, 1987; Banks & Schultz, 2005). Germination tests are simple, quick, reliable, less expensive and do not require major equipment (Dutka, 1989; Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989; Wang & Freemark, 1995; Wang *et al.*, 2001; Di Salvatore *et al.*, 2008). Tests are normalized, but at some points parameters are very variable (seed abundance, container quality, growth substrate, test duration, lettuce variety...). In 2008, Di Salvatore *et al.* compared germination success using 2 different substrates: agar agar and filter paper: results showed that germination rates were not affected by substrates. However, we recently pointed out *intraspecific* ecotoxicological responses differences between 4 lettuce varieties (Priac *et al.*, submitted). We performed ecotoxicological germination tests on two different lettuce

varieties, depending on their sensitivity to industrial polycontaminated DW (Priac *et al.*, submitted): Appia and Batavia dorée de printemps, being respectively the more and less sensitive lettuce assessed then. If some research reported variety sensitivity differences while studying physical parameters as salt and salt plus temperature effects (Ayers *et al.*, 1951; Maas & Hoffman, 1977; Shannon & McCreight, 1984; Pasternak *et al.*, 1986; Coons *et al.*, 1990) and one comparing Cd effects on lettuce variety (John & Van Laerhoven, 1970), to our knowledge, no study compared direct ecotoxicological impacts on germination rate and plantlet elongation of chemical pollutions as ST polycontaminated DW.

The aims of this work were to (i) identify and quantify DWs metal composition, (ii) try to explain physiologically (internal composition, uptake capacity) the observed ecotoxicological response differences, and (iii) show that the choice of the variety can be determinant for the ecotoxicity assessment.

2.2.2 Material and Methods

2.2.2.1 Industrial discharge waters

Discharge waters were collected at the outlet of effluent decontamination stations (physicochemical treatment preceding environmental release) of 2 different companies (denoted Co1 and Co2) in the Franche-Comté region. Each of the 2 DW came from a sample characteristic of a day's work in the plant. Each sample was tested following the same DW concentration range: 25, 50, 75 and 100%. All dilutions were prepared in reverse osmosis water (ROW; pH 6). The pH was

measured using a portable pH meter (model 3110 WTW, Alès, France).

2.2.2.2 Lettuce Seeds

Two lettuce (*Lactuca sativa* (L.)) varieties were germinated: Appia (A) and Batavia dorée de printemps (B). As improper storage could lead to seeds quality and test results alteration (Beauregard & Ridal, 2000), seeds were all kept under laboratory conditions, in the dark and shielded from large modifications of temperature and moisture.

2.2.2.3 Control and toxicity test

Germination bioassay (germination test ISO 17126, 2005) were realized following the method described in detail by Priac *et al.* (submitted). For this study, 20 plump undamaged seeds were laid on the filter paper in each dish (100*15mm disposable plastic Petri dishes) and watered with ROW (control dishes), DW sample (concentration range: 0, 25, 50, 75 and 100%). Each condition was carried out by 3 *triplicates*, to provide enough vegetal matter for the ICP analysis. All dishes were kept in the dark, at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, for 7 days of exposure. As recommended by the standard, DW pH must be between 5.5 and 9. To validate the test, germination rates (GR) of controls must be higher than or equal to 90%. After 7 days, germinated seeds were counted to calculate GR, using the following equation:

$$GR = \frac{GSS}{TSN} \times 100$$

where GSS is the number of Germinated Seeds in the Sample and TSN the total seeds number.

2.2.2.4 Statistical analysis

All homoscedasticities were tested using a Bartlett test as prerequisite for parametric test. The germination rates were compared using the Chi² test (significance

threshold of $p < 0.05$). All statistical analyses were performed with R (2.15.1) (R Development Core Team, 2013, www.r-project.org). Dose-dependent curves and EC_{50} values were calculated with Hill's model using the macro Excel Regtox free version EV 7.0.6.

2.2.2.5 Chemical analysis

Seeds (3 samples of each variety) and plantlets (3 samples per tested condition) from each triplicate were then pooled, oven dried at 60°C to a constant dry mass, weighted and prepared for analysis. Approximately 50 mg of each dried sample were digested with nitric acid and hydrogen peroxide (3.5:1 v/v) (HNO_3 65 % and H_2O_2 30% w/v ultra-trace analysis grade, Fisher Scientific, Illkirch, France, respectively) in a digestion system (DigiPREP, SCP Sciences, Courtaboeuf, France). After digestion, the samples were diluted by adding ultra-pure water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Samples were systematically filtered before analysis (DigiFILTER, SCP Sciences, Courtaboeuf, France). Metal (Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Ti and Zn) concentrations were measured in all samples by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP AES, iCAP 6500 radial model, ThermoFisher, Courtaboeuf, France). Results were expressed as milligrams per grams of dry mass ($\text{mg g}^{-1} \text{ dm}$) for the total vegetal sample, and for mg L^{-1} DW samples. Blank samples and Certified Reference Materials (oriental basma tobacco leaves, INCT-OBTL-5, LGC Promochem, Molsheim, France; Hard Drinking Water, ERM-CA 011B, LGC Promochem, Molsheim, France) were similarly prepared and analyzed with the samples. Quality control (QC) solutions were periodically analyzed to monitor for potential temporal instrument deviation.

Average recoveries of the CRM were always situated in the range of 80 to 120%.

2.2.3 Results and Discussion

The first aim of the study was to identify and quantify the metals present in the two samples. Eleven over 22 MTE were detected in Co1 (Co, Fe, Mn, Ni, Zn, Ca, K, Mg, Na, P and Si) and 8 were detected in Co2 (Al, Ti, Mn, Ca, K, Mg, Na and Si); As, Cd, Cr, Hg, Pb, Sb, Sn and Cu were below quantification limit (QL) or detection limit (DL) (Table 1). Results showed that only 6 elements were detected on both samples (Mn, Ca, K, Mg, Na and Si), which were nutritional essential components for an organism like the lettuce. Both DWs fit environmental quality criteria.

Ecotoxicology assessment completes physicochemical analyses (Cairns & Mount, 1990; Fent, 2004; Fjällborg *et al.*, 2006): both industrial DWs were under regulatory limits and considered as “chemically correct”, but germination tests showed differential impacts on lettuce seed germination (Table 2). DW samples EC_{50} were both incalculable for Batavia variety, as GR was superior to 50% for each tested condition. Appia variety appeared more sensitive to DW samples than Batavia, as Co1 EC_{50} was 62.25% and 23.37% for Co2. *Interspecific* ecotoxicological differences have already been pointed out (Adema & Henzen, 1989; Baud-Grasset *et al.*, 1993; Arambasic *et al.*, 1995; Banks & Schultz, 2005; Clemens, 2006; Alvarenga *et al.*, 2007). Coons (1990) showed *intraspecific* response differences to temperature enhanced in presence of NaCl. As previously demonstrated (Priac *et al.*, submitted), varieties were here confirmed to be more (var A) or less (var B) sensitive to ST DW.

The seeds analysis reported in [Table 3](#) showed that Appia seeds are significantly richer in Cd, Ni and Na than Batavia seeds (respectively, 404, 301 and 129%). Nickel has been considered for a long time as a *toxic element*. Nowadays, it is considered as an essential element, according to the symptoms apparition in case of *deficiency* and its role in the urease metabolism, for animals (*e.g.*: Nielsen *et al.*, 1975; Muysen *et al.*, 2004), bacteria (*e.g.*: Wu, 1992) and plants (*e.g.*: Eskew *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 1987 a, b; Gerendas *et al.*, 1999; Follmer, 2008). Yet, it is curious to find cadmium in detectable quantities in intact seeds, as it has no biological functions and induces toxic effects on plants as germination and growth inhibition, photosynthetic alterations, morphological and genetic damages (*e.g.* Pålsson, 1989; Das *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2002; Siddiqui *et al.*, 2009). Meanwhile, Simon (1977) reported ecotypic Cd tolerance, jointly with Zn and Pb. Previous studies (Moise *et al.*, 2005; Seregin & Kozhevnikova, 2006) pointed out a more than possible MTE coat (or pericarp) permeability, especially for Cd, Ni and Pb; Cd which was found to be restricted to the pericarp, even if seeds are known to provide protection against metallic stress as there is limited MTE influx (Kranter & Colville, 2011). Still, cadmium seeds contamination might be explained *via* mother plants contamination, which could have been treated with pesticides or phosphate enriched fertilizers (Schroeder & Balassa, 1963; Robert & Juste, 1997; Byrne *et al.*, 2009).

2.2.3.1 Differential uptake and focus on cadmium

[Tables 4a](#) and [4b](#) show the inner composition of the different treatments pooled plantlets for respectively Co1 and

Co2 DW. As it was one of the significantly different element measured in lettuce seeds, we decided to focus on Cd and its interactions with other elements. To easily visualize the elements concentration variations, we logged the results of Cd plantlets concentrations ([Figure 1](#)). Batavia plantlets analyses showed Cd concentrations decreasing ($p=0.038$) while Fe and Zn values are slightly ($p=0.052$) and significantly ($p=0.017$) increasing. Appia plantlets analyses showed similar results (respectively $p=0.01$, $p=0.037$ and $p=0.002$). Because of the lack of essential nutrients transporters specificity (Clemens, 2006), Cd has been shown several times to act like antagonist and to be transported through the same transport systems used for iron, zinc and calcium (Thys *et al.*, 1991; Siedlecka, 1995; Verret *et al.*, 2004; Clemens, 2006; Zorrig *et al.*, 2011), which seemed to confirm our results.

Appia and Batavia seemed to follow the same similar trend although Appia trace element concentrations appeared superior to Batavia's (except for the Zn values for control and Co2 25%-diluted). According to Antonovics *et al.* (1971), cations like Zn^{2+} and Fe^{2+} have prospective effect against Cd^{2+} toxicity. Surprisingly, whereas Appia appeared to be richer than Batavia in these essential elements, ecotoxicological effects, as germination success, tend to be less effective. Alexander *et al.* (2006), or Koeppel before him (1977), showed not only *interspecific* uptake, accumulation or retention differences between growing plants watered with synthetic solutions (spinach, carrot, French bean, pea, onion and lettuce), but also *intraspecific* significative differences, especially with lettuce. Plant tolerance to heavy metals can be achieved by different strategies (Simon, 1977; Barcelo & Poschenrieder, 1990; Sanita di Toppi &

Gabbrielli, 1999) as selective metal exclusion, complexation...This could explain not only the decreasing inner composition event in macronutrient but also the earlier and more intense mortality when watered with raw and diluted industrial discharge water samples. Nevertheless, we should keep in mind that lettuce accumulator status is not settled yet. *Lactuca sativa* is

indeed considered as well as a hyperaccumulator for among others Pollard *et al.* (2002), Mensch & Baize (2004) and Alexander *et al.* (2006), as a non hyperaccumulator for Benzarti *et al.* (2008) reporting Baker *et al.* (1994) previous works.

Table II.11. Metals concentrations in the discharge waters from Co1 and Co2 industries (mg L⁻¹)

Element	LDM	LQM	Co1	Co2
Al	0.0062	0.0207	<i>n.d.</i>	1.537
Co	0.0009	0.0029	0.028	<i>n.d.</i>
Ti	0.0007	0.0025	<i>n.d.</i>	0.025
Fe	0.0011	0.0037	3.36	<i>n.d.</i>
Mn	0.0002	0.0006	25.91	0.114
Ni	0.0011	0.0038	0.75	<i>n.d.</i>
Zn	0.0002	0.0005	0.227	<i>n.d.</i>
Ca	0.0048	0.0160	19.55	24.76
K	0.0223	0.0744	42.58	8.58
Mg	0.0048	0.0161	3.42	2.57
Na	0.0060	0.0199	316.28	253.40
P	0.0026	0.0086	3.72	<i>n.d.</i>
Si	0.0035	0.0116	4.99	2.50

n.d. are values < detection or quantification limit;

As, Cd, Cr, Hg, Pb, Sb, Se, Sn and Cu were under limits for both Co1 and Co2 samples.

Table II.12. Germination Rates (GR) and EC₅₀ values for the 2 lettuce cultivars A and B watered with 2 DW samples.

Sample	pH	Lettuce cultivar	Treatment (tested DW concentration)				EC ₅₀
			25%	50%	75%	100%	
Co1	8.5	A	82 ± 8.5	53 ± 14.3	33 ± 6.2	28 ± 14.3	62.25
	± 0.1	B	73 ± 2.4	93 ± 2.4	87 ± 6.2	77 ± 14.3	-
Co2	8.4	A	47 ± 16.3	17 ± 9.1	2 ± 3.4	1 ± 1.6	23.37
	± 0.1	B	94 ± 3.7	89 ± 6.4	93 ± 6.7	66 ± 11	-

Control Germination Rate > 90%

Table II.13. Mean (and standard deviation) values for trace element and nutrients concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ of dry mass) in lettuce (*Lactuca sativa* L., cultivars Appia and Batavia dorée de printemps) seeds.

Cultivar	Al	Cd **	Cu	Fe	Mn *	Ni ***	Zn
A	21.59 \pm 2.46	0.42 \pm 0.02	21.96 \pm 1.4	181.28 \pm 19.30	26.95 \pm 1.04	8.90 \pm 0.33	126.57 \pm 7.65
B	23.99 \pm 1.04	0.10 \pm 0.01	17.96 \pm 0.16	147.86 \pm 6.64	23.64 \pm 1.00	2.89 \pm 0.06	108.85 \pm 3.07
	Ca	K	Mg	Na *	P	Si	
A	2146.12 \pm 130.29	7895.62 \pm 350.22	4308.95 \pm 242.60	256.64 \pm 18.29	9679.8 \pm 538.77	21.65 \pm 2.61	
B	1938.28 \pm 22.63	8493.49 \pm 214.12	4016.11 \pm 80.44	199.00 \pm 2.37	8336.74 \pm 109.15	21.08 \pm 0.34	

As, Co, Cr, Hg, Pb, Sb, Se and Sn were under detection or quantification limits in both “A” and “B” seeds

*: p value < 0.05; **: p value < 0.01; ***: p value < 0.001

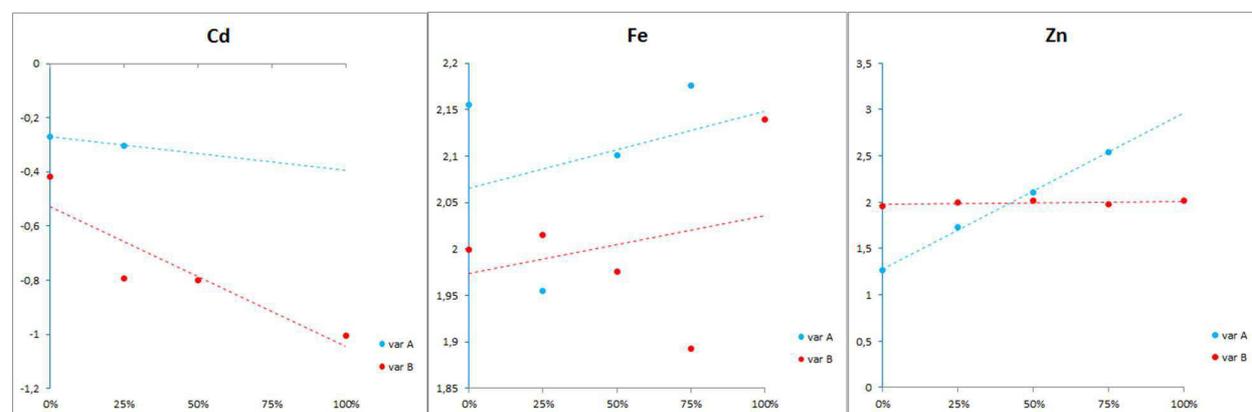


Figure II.2. Cd, Fe and Zn logged values (and single linear regression) of Appia and Batavia one week growing plantlets against the DW concentration.

Table II.14a. Metals and majors Appia and Batavia dorée de printemps Co1 watered plantlet concentrations (expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry mass).

		Treatment (tested effluent concentration)									
		var Appia					var Batavia dorée de printemps				
Sample	Element	Control	25%	50%	75%	100%	Control	25%	50%	75%	100%
Co1	Ca ^(a)	3.32 ± 0.41	6.87 ± 0.09	6.98 ± 0.15	7.76 ± 0.63	8.70 ± 0.67	5.09 ± 0.25	6.16 ± 0.35	6.88 ± 0.12	7.60 ± 0.17	7.58 ± 0.21
	Cu	38.12 ± 1.96	40.16 ± 0.56	39.37 ± 2.50	37.41 ± 2.86	44.22 ± 8.49	34.37 ± 0.85	33.03 ± 0.76	33.32 ± 0.81	32.45 ± 1.61	32.93 ± 0.46
	Fe	114.13 ± 2.20	106.37 ± 3.16	112.79 ± 17.40	90.19 ± 13.46	165.12 ± 31.14	75.66 ± 6.53	74.86 ± 3.35	72.76 ± 8.11	73.39 ± 11.54	81.29 ± 3.20
	K ^(a)	11.75 ± 0.49	15.84 ± 0.50	19.64 ± 1.23	20.96 ± 0.20	35.87 ± 3.95	13.63 ± 0.76	15.49 ± 0.42	17.94 ± 0.31	21.26 ± 0.40	23.58 ± 0.58
	Mg ^(a)	5.59 ± 0.16	6.07 ± 0.04	5.96 ± 0.07	5.84 ± 0.22	6.36 ± 0.96	5.06 ± 0.13	5.08 ± 0.04	4.83 ± 0.12	4.94 ± 0.10	4.72 ± 0.06
	Mn	53.99 ± 2.45	62.38 ± 0.99	63.79 ± 0.87	62.91 ± 4.12	69.37 ± 7.21	38.66 ± 0.66	50.47 ± 2.54	50.21 ± 1.38	53.15 ± 0.97	51.59 ± 1.61
	Na ^(a)	103.26 ± 9.29	129.52 ± 3.03	116.30 ± 3.83	120.35 ± 9.03	105.53 ± 4.66	88.82 ± 9.43	107.90 ± 9.29	99.44 ± 5.21	107.87 ± 3.72	99.01 ± 4.58
	Ni	10.89 ± 1.35	12.70 ± 0.54	13.51 ± 1.01	13.33 ± 1.88	13.23 ± 0.00	5.16 ± 0.33	5.04 ± 0.30	5.71 ± 0.56	7.48 ± 0.58	8.18 ± 0.40
	P ^(a)	12.12 ± 0.51	12.63 ± 0.17	12.60 ± 0.19	12.33 ± 0.30	13.64 ± 2.26	10.20 ± 0.07	9.76 ± 0.21	9.62 ± 0.15	9.81 ± 0.13	9.55 ± 0.23
	Si	<i>< DL or QL</i>					26.11 ± 3.72	33.62 ± 8.78	23.21 ± 6.67	16.02 ± 1.81	16.53 ± 1.58
	Zn	142.47 ± 5.25	158.60 ± 15.33	157.50 ± 6.97	150.92 ± 7.11	169.12 ± 27.16	138.09 ± 10.66	122.85 ± 9.85	125.76 ± 1.24	131.12 ± 3.72	125.45 ± 7.72

Al, As, Cd, Co, Cr, Hg, Pb, Sb, Se, Sn and Ti were under detection or quantification limits in both “A” and “B” plantlets

^(a) mean concentration values and sd in mg g^{-1} of dry matter

Table II.14b. Metals and majors Appia and Batavia dorée de printemps Co2 watered plantlet concentrations (expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry mass).

		Treatment (tested effluent concentration)										
		var Appia					var Batavia dorée de printemps					
Sample	Element	Control	25%	50%	75%	100% ^(b)	Control	25%	50%	75%	100%	100% ^(b)
Co2	Al	27.84 ± 5.46	48.35 ± 12.37	< DL or QL	< DL or QL	104.05	40.34 ± 9.12	60.34 ± 4.01	86.99 ± 6.97	102.74 ± 8.40	137.24	117.76
	Ca ^(a)	5.67 ± 0.08	8.66 ± 0.58	10.45 ± 0.87	6.35	4.27	6.23 ± 0.15	8.90 ± 0.79	8.81 ± 0.31	7.67 ± 0.61	9.15	4.81
	Cd	0.54 ± 0.01	0.50 ± 0.12	< DL or QL	< DL or QL	0.48	0.38 ± 0.14	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.00	< DL or QL	0.10	< DL or QL
	Co	< DL or QL	8.88 ± 0.41	16.69 ± 2.07	13.68	10.91	1.11 ± 0.14	9.94 ± 0.94	14.50 ± 0.71	15.85 ± 1.37	19.56	11.88
	Cr	6.46 ± 2.27	6.20 ± 0.44	< DL or QL	< DL or QL	2.78	6.64 ± 3.11	4.33 ± 0.71	3.84 ± 0.93	4.08 ± 0.84	5.11	2.99
	Cu	33.17 ± 0.86	28.95 ± 2.54	33.85 ± 5.31	31.63	24.71	30.32 ± 1.00	27.43 ± 2.22	23.38 ± 1.14	21.32 ± 1.07	23.66	18.25
	Fe	142.87 ± 19.56	90.25 ± 13.02	126.10 ± 21.81	149.94	265.99	99.92 ± 11.62	103.61 ± 15.89	94.60 ± 14.05	78.23 ± 9.54	137.82	88.74
	K ^(a)	10.61 ± 0.13	19.81 ± 0.66	39.91 ± 4.31	33.63	7.67	12.45 ± 0.42	15.49 ± 1.49	19.67 ± 1.36	21.53 ± 1.22	30.66	5.72
	Mg ^(a)	5.60 ± 0.14	4.85 ± 0.35	5.12 ± 0.07	3.35	4.33	6.05 ± 0.05	5.34 ± 0.44	4.79 ± 0.13	4.41 ± 0.18	4.66	3.74
	Mn	56.99 ± 1.07	94.09 ± 3.68	170.71 ± 28.41	121.45	35.99	56.50 ± 2.99	83.58 ± 8.86	87.72 ± 3.03	72.99 ± 1.19	88.75	33.44
	Na ^(a)	61.59 ± 2.20	62.47 ± 4.17	71.60 ± 58	35.92	8.28	62.28 ± 0.30	73.13 ± 7.52	67.25 ± 0.54	55.85 ± 5.60	63.73	8.20
	Ni	1309 ± 0.85	12.87 ± 0.80	16.29 ± 2.88	15.90	10.09	6.46 ± 0.21	5.69 ± 0.54	5.39 ± 0.38	5.17 ± 0.26	5.75	4.00
	P ^(a)	13.75 ± 0.26	12.50 ± 0.99	14.41 ± 0.08	9.23	13.11	13.62 ± 0.17	12.18 ± 1.00	11.36 ± 0.44	11.03 ± 0.48	11.79	10.50
	Si	33.45 ± 0.58	32.87 ± 4.61	70.64 ± 20.44	71.12	15.55	38.51 ± 2.33	38.84 ± 9.26	36.15 ± 2.88	32.69 ± 2.28	26.87	18.64
Ti	3.21 ± 0.35	5.01 ± 0.39	< DL or QL	< DL or QL	3.34	3.86 ± 0.42	5.40 ± 0.68	4.88 ± 0.34	4.30 ± 0.42	4.93	3.08	
Zn	18.32 ± 3.17	54.25 ± 23.52	127.04 ± 15.46	348.56	5.47	91.09 ± 3.07	100.31 ± 9.54	104.93 ± 7.24	94.65 ± 3.11	102.81	59.25	

Co2: As, Hg, Pb, Sb, Se and Sn were under detection or quantification limits in both “A” and “B” plantlets

^(a) mean concentration values and sd in mg mg⁻¹ of dry matter

^(b) analyses were made on non-germinated plantlets

2.2.4 Conclusion

Rapid population growth and its increasing food demand made water shortage and wastewater, as industrial discharged waters, reuse a crucial economic, environmental and sanitary issue. As a much cultivated crop, a bioassays accurate indicator and a controversially high metal as Cd accumulator plant, lettuce appeared to be a good model to study metals ecotoxicological effects. The results of this study, besides the DW from ST industries daily chemical variability, indicated that, considering GR and metal uptake, (i) ecotoxicological lettuce sensitivity appeared to rely mostly on variety, Appia being more sensitive than Batavia, (ii) the 2 varieties seemed to follow the same uptake pattern, in spite of higher measured concentrations in Appia's variety, (iii) it is difficult to know exactly how metallic and non-metallic compounds might interact (antagonism, synergy...) and affect this plant germination and early stages of development. As we did not show differential uptake pattern and as Cd plant uptake could not be linked to its differential distribution (Wagner, 1993; Clemens, 2006), further investigations about lettuce variety differences might determine metals and nutrients differential translocations. We also suggest to carefully chose the bioindicator variety and to mention it in next studies

Acknowledgements

The authors thank Caroline Amiot, Jocelyn Paillet and Xavier Hutinet for technical assistance. Authors are also grateful to the *Ville de Besançon* which funded Anne Priac's PhD, and the *Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse* and to the FEDER (*Fonds Européens de Développement Régional*) for financial support (NIRHOFEX Program 2013-2016).

2.2.5 References

- Adema DMM, Henzen L. 1989. A comparison of plant toxicities of some industrial chemicals in soil culture and soilless culture. *Ecotoxicol Environ Saf*, 18:219-229.
- Alexander PD, Alloway BJ, Dourado AM. 2006. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environ Pollut*, 144 :736-745.
- Alvarenga P, Palma P, Gonçalves A, Fernandes R, Cunha-Queda AC, Duarte E, Vallini G. 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environ Int*, 33:505-513.
- Antonovics J, Bradshaw AD, Turner RG. 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Adv Environ Sci Technol*, 7:1-85.
- Arambašić MB, Bjelić S, Subakov G. 1995. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: Comparative investigations and the practical applications. *Water Research*, 29:497-503.
- Ayers AD, Wadleigh CH, Bernstein L. 1951. Salt tolerance of six varieties of lettuce. *Proc Amer Soc Hort Sci*, 57:237-242.
- Backhaus T, Altenburger R, Arrhenius Å, Blanck H, Faust M, Finizio A, Gramatica P, Grote M, Junghans M, Meyer W, Pavan M, Porsbring T, Scholze M, Todeschini R, Vighi M, Walter H, Grimme LH. 2003. The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. *Cont Shelf Res*, 23:1757-1769.
- Baker AJM, Reeves RD, Hajar ASM. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. et C. Presl (Brassicaceae). *New Phytol*, 127:61-68.
- Bahri A, Brissaud F. 1996. Wastewater reuse in Tunisia : Assessing a national policy. *Wat Sci Tech*, 33:87-94.
- Banks MK, Schultz KE. 2005. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soil. *Water Air Soil Poll*, 167:211-219.

- Barcelo J, Poschenrieder C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J Plant Nutr*, 13:1-37.
- Barton L, Schipper LA, Barkle GF, McLeod M, Speir TW, Taylor MD, McGill AC, van Schaik AP, Fitzgerald NB, Pandey SP. 2005. Land application of domestic effluent onto four soil types: plant uptake and nutrient leaching. *J Environ Qual*, 34:635-43.
- Bascombe AD, Ellis JB, Revitt DM, Shutes RBE. 1990. The development of ecotoxicological criteria in urban catchment. *Water Sci Technol*, 22:173-179.
- Baud-Grasset F, Baud-Grasset S, Safferman SI. 1993. Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere*, 26:1365-1374.
- Beauregard T, Ridal J. 2000. Evaluation of six simple bioassays for the determination of drinking water quality—Canadian results. *Environ Toxicol*, 15:304-311.
- Ben Fredj F, Wali A, Khadhraoui M, Han J, Funamizu N, Ksibi M, Isoda H. 2014. Risk assessment of heavy metal toxicity of soil irrigated with treated wastewater using heat shock proteins stress responses: case of El Hajeb, Sfax, Tunisia. *Environ Sci Pollut Res*, 21 :4716-4726.
- Benzarti S, Mohri S, Ono Y. 2008. Plant response to heavy metal toxicity: comparative study between the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (ecotype Ganges) and nonaccumulator plants: lettuce, radish, and alfalfa. *Environ Toxicol*, 23:607-616.
- Bierkens J, Klein P, Corbisier P, Van den Heuvel R, Verschaeve L, Weltens R, Schoeters G. 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 37:2935-2947.
- Bixio D, Thoeys C, De Koning J, Joksimovic D, Savic D, Wintgens T, Melin T. 2006. Wastewater reuse in Europe. *Desalination*, 187:89-101.
- Byrne C, Divekar SD, Storchan GB, Parodi DA, Marin MB. 2009. Cadmium – a metallo-hormone? *Toxicol Appl Pharm*, 238:266-271.
- Brown PH, Welch RM, Cary EE. 1987a. Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol*, 85:801-803.
- Brown PH, Welch RM, Cary EE, Checkai RT. 1987b. Micronutrients: Beneficial effects of nickel on plant growth. *J Plant Nutr*, 10:2125-2135.
- Cairns JJ, Mount DI. 1990. Aquatic toxicology, part 2 of a four part series. *Environ Sci Technol*, 24:154-160.
- Cairns JJ, Pratt JR. 1989. The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia* 188/189:5-20.
- Castillo GC, Vila IC, Neild E. 2000. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environ Toxicol*, 15:370-375.
- Charles J, Sancey B, Morin-Crini N, Badot PM, Degiorgi F, Trunfio G, Crini G. 2011. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce *Lactuca sativa* as a bioindicator. *Ecotox Environ Saf*, 7:2057-2064.
- Charles J, Crini G, Degiorgi F, Sancey B, Morin-Crini N, Badot PM. 2014. Unexpected toxic interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) exposed to binary copper and nickel mixtures. *Environ Sci Pollut Res*, 21:1099-1111.
- Clemens S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88 :1707-1719.
- Codina JC, Perez-Garcia A, Romero P, Vincente A. 1993. A comparison of microbial bioassays for the detection of metal toxicity. *Arch Environ Con Tox*, 25:250-254.
- Coons JM, Kuehl RO, Simons NR. 1990. Tolerance of ten lettuce cultivars to high temperature combined with NaCl during germination. *J Am Soc Hortic Sci*, 115:1004-1007.
- Das P, Samantaray S, Rout GR. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environ Pollut*, 98:29-36.
- Di Salvatore M, Carafa AM, Carratù G. 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73:1461-1466.

- Dutka BJ. 1989. Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada.
- EPA. 1996. Ecological effects test guidelines: Seed germination, root elongation toxicity test. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances 850 4200. Washington DC: US Environmental Protection Agency.
- Eskew DL, Welch RM, Norvell WA. 1984. Nickel in higher plants further evidence for an essential role. *Plant Physiol*, 76:691-693.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>. Used: 21-07-2014.
- Farré M, Barceló D. 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trac-Trend Anal Chem*, 22:299-310.
- FDA. 1987. Environmental Assessment Technical Assistance: Seed germination and root elongation. Washington DC: US Food and Drug Administration Department; of Health and Human Services.
- Fent K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205:223-240.
- Fjällborg B, Li B, Nilsson E, Dave G. 2006. Toxicity identification evaluation of five metals performed with two organisms (*Daphnia magna* and *Lactuca sativa*). *Arch Environ Con Tox*, 50:196-204.
- Follmer C. 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69:18-28.
- Gerendás J, Polacco JC, Freyermuth SK, Sattelmacher B. 1999. Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J Plant Nutr Soil Sci*, 162:241-256.
- ISO (2005) Soil Quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.). International Organisation for Standardization ISO 17126. Geneve, Switzerland.
- John MK, van Laerhoven CJ. 1970. Differential effects of cadmium on lettuce varieties. *Environ Pollut*, 10:163-173.
- Kadirova ZC, Hojamberdiev M, Katsumata KI, Isobe T, Matsushita N, Nakajima A, Okada K. 2014. Photodegradation of gaseous acetaldehyde and methylene blue in aqueous solution with titanium dioxide-loaded activated carbon fiber polymer materials and aquatic plant ecotoxicity tests. *Environ Sci Pollut R*, 21 :4309-4319.
- Katz BG, Griffin DW, Davis JH. 2009. Groundwater quality impacts from the land application of treated municipal wastewater in a large karstic spring basin: chemical and microbiological indicators. *Sci Total Environ*, 407:2872-86.
- Koeppel DE. 1977. The uptake, distribution, and effect of cadmium and lead in plants. *Sci Total Environ*, 7:197-206.
- Komjarova I, Blust R. 2009. Effect of Na, Ca and pH on simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the water flea *Daphnia magna* measured using stable isotopes. *Aquatic Toxicol*, 94:81-86.
- Kranner I, Colville L. 2011. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environ Exp Bot*, 72:93-105.
- Libralato G, Ghirardini Annamaria V, Francesco A. 2010. How toxic is toxic? A proposal for waste water toxicity hazard assessment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73:1602-1611.
- Maas EV, Hoffman GF. 1977. Crop salt tolerance: Evaluation of existing data. *J Irrig Drain*, 504:187-198.
- Mayer AM, Poljakoff-Mayber A. 1989. The germination of seeds, 4th Edition. New-York : Pergamon Press.
- Mench M, Baize D. 2004. Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en traces. *Cour Environ INRA*, 52:31-56.
- Miller WE, Peterson SA, Greene JC, Callahan CA. 1985. Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites. *J Environ Qual*, 14:569-574.
- Moïse JA, Han S, Gudynaite-Savitch L, Johnson DA, Miki BL. 2005. Seed coats: structure,

- development, composition, and biotechnology. *In vitro Cell Dev-Pl*, 41:620-644.
- Morin-Crini N, Druart C, Gavaille S, Lagarrigue C, Crini G. 2013. Analytical monitoring of the chemicals present in the discharge water generated by the surface treatment Industry. *J Environ Protect*, 4:53-60.
- Muysen BTA, Brix KV, DeForest DK, Janssen CR. 2004. Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environ Rev*, 12:113-131.
- Nielsen FH, Ollerich DA. 1974. Nickel: a new essential trace element. *Fed Proc*, 33:1767-1771.
- OECD. 2003. Terrestrial plant test ; Seedling emergence and growth test. Organization for Economic Cooperation and Development Guideline 208: Paris.
- Påhlsson AMB. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air Soil Poll*, 47:287-319.
- Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Féraud JF, Grand C, Bispo A. 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci Total Environ*, 363:114-125.
- Pasternak D, DeMalach Y, Borovic I, Shram M, Aviram C. 1986. Irrigation with brackish water under desert conditions, IV. Salt tolerance studies with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agr Water Manage*, 11:303-311.
- Pollard AJ, Powell KD, Harper FA, Smith JAC. 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *CRC Cr Rev Plant Sci*, 21:539-566.
- Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Gárate A. 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca sp.* Cd-Mn interaction. *Plant Sci*, 162:761-767.
- Ratsch HC, Johndro D. 1984. Comparative toxicity of six test chemicals to lettuce using two root elongation test methods. *Environ Monit Assess*, 6:267-276.
- Renoux AY, Tyagi RD, Samson R. 2001. Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. *Water Res*, 35:1415-1424.
- Ribo JM. 1997. Interlaboratory comparison studies of luminescent bacteria toxicity bioassay. *Environ Toxic Water*, 12 :283-294.
- Robert M, Juste C. 1997. Stocks et flux d'éléments traces dans les sols du territoire. *In Aspects sanitaires et environnementaux de l'épandage agricole des boues d'épuration urbaines*, ADEME Journées techniques des 5 et 6 juin 1997.
- Sancey B, Trunfio G, Charles J, Minary JF, Gavaille S, Badot PM, Crini G. 2011. Heavy metals removal from industrial effluents by adsorption on cross-linked starch: chemical study and impact on water toxicity. *J Environ Management*, 92:765-772.
- Sanita di Toppi L, Gabbriellini R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot*, 41:105-130.
- Schroeder HA, Balassa JJ. 1963. Cadmium: uptake by vegetables from superphosphate in soil. *Science*, 140:819-820.
- Schüürmann G, Market B. 1998. *Ecotoxicology: ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects*. Spektrum Akad Verlag, Berlin.
- Seregin IV, Kozhevnikova AD. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ J Plant Physiol*, 53:257-277.
- Shannon MC, McCreight JD. 1984. Salt tolerance of lettuce introductions. *HortScience*, 19:673-675.
- Shoji R, Sakoda A, Sakai Y, Suzuki M. 2000. Formulating bioassay data of chemicals and environmental water. *Water Sci Technol*, 42:115-124.
- Siddiqui S, Meghvansi MK, Wani MA, Jabee F. 2009. Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L. *Acta Physiol Plant*, 31:531-536.
- Siedlecka A. 1995. Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Soc Bot Pol*, 64:265-272.
- Simon E. 1977. Cadmium tolerance in population of *Agrostis tenuis* and *Festuca ovina*. *Nature*, 265:328-330.
- Thys C, Vanthomme P, Schrevens E, Proft MD. 1991. Interactions of Cd with Zn, Cu, Mn and Fe for lettuce (*Lactuca sativa* L.) in

- hydroponic culture. *Plant Cell Environ*, 14:713-717.
- Toze S. 2006. Reuse of effluent water-benefits and risks. *Agric Water Manage*, 80:147-159.
- Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P. 2004. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett*, 576:306-312.
- Wagner GJ. 1993. Accumulation of cadmium in crops plants and its consequences to human health. *Adv Agron*, 51:173-12.
- Wang W. 1987. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environ Toxicol Chem*, 6:409-414.
- Wang W, Freemark K. 1995. The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 30:289-301.
- Wang XD, Sun C, Gao S, Wang L, Shuokui H. 2001. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosphere*, 44:1711-1721.
- Wangberg SA, Bergström B, Blanck H, Svanberg O. 1995. The relative sensitivity and sensitivity patterns of short-term toxicity tests applied to industrial waste water. *Environ Toxic Water*, 10:81-90.
- Wu LF. 1992. Putative nickel-binding sites of microbial proteins. *Res Microbiol*, 143:347-351.
- Zorrig W, Abdely C, Berthomieu P. 2011. The phylogenetic tree gathering the plant Zn/Cd/Pb/Co P1B-ATPases appears to be structured according to the botanical families. *CR Acad Sci III-Vie*, 334:863-871.

2.3 Conclusions & Perspectives

Les différences d'accumulation des ETMs sont relativement connues, pour différentes espèces végétales comme le maïs, le blé, le riz *etc.* (Koeppel, 1977 ; Zhou *et al.*, 1994 ; Siedleka, 1995 ; Clemens, 2006). Afin d'affiner ces résultats, il semble raisonnable d'envisager de doser, *pour chaque variété*, chaque segment de la tige de façon séparée (Figure II. 3 ; Raskin *et al.*, 1994 ; Siedlecka, 1995) : racine, tige et **cotylédons** des plantules de variétés A et B. Car si les *patterns* de concentrations d'ETMs mesurées tendent à être semblables, il semble également que les stratégies de ces deux variétés soient différentes : l'une excluant (*excluder*) et l'autre accumulant (*include* ou *accumulator*) (Baker, 1981).

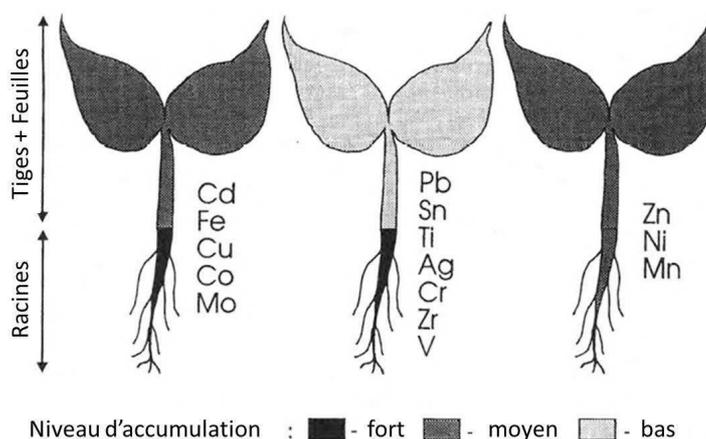


Figure II.3. Différentes tendances d'accumulation et de distribution d'ETM en fonction de la partie végétale (racine, tige, feuille) de la plante (d'après Siedlecka, 1994).

Remarque : Si la capacité d'accumuler des métaux, du Cd en particulier, est discutée, elle est néanmoins acceptée pour une certaine partie de la communauté scientifique (Mahler *et al.*, 1978 ; Logan *et al.*, 1997 ; Alexander *et al.*, 2006). Certaines études tendent même à montrer que de faibles concentrations de Cd auraient un effet positif voire stimulant sur la croissance de certaines plantes (Mahler *et al.*, 1978 ; Khan & Khan, 1983 ; Kennedy & Gonsalves, 1987 ; Azizian *et al.*, 2011 ; Zorrig *et al.*, 2013)...Le cadmium serait-il en passe d'être considéré comme un nouvel oligo-élément pour les plantes, comme le nickel il y a quelques années ?

Toutes les expériences n'aboutissent pas à la publication d'un article (!). Leurs résultats n'en sont pas moins intéressants. Les deux chapitres suivants regroupent et présentent deux expériences de tests de germination, l'une sur des déchets solides (Chapitre 3), l'autre sur la capacité de régénération des semences non germées (Chapitre 4), menées au cours de ce doctorat.

3 ÉTUDE PRELIMINAIRE I : DECHETS SOLIDES

3.1 Introduction

3.1.1 Contexte

“*Recyclage*”, “*Reuse*”, “*Alternative*”¹, ..., tous ces mots sont socialement, politiquement mais aussi économiquement et scientifiquement à la mode. Sans entrer dans des considérations politico-écologistes, ces recyclages et réutilisation de produits et substances sont parfois un unique moyen de survie : l’utilisation de rejets municipaux ou industriels est parfois le seul moyen d’irriguer et d’amender les champs quand l’eau potable est une denrée rare (*e.g.* Vazquez-Montiel *et al.*, 1996 ; Mapanda *et al.*, 2005). Hors ces eaux, ces boues ne sont pas exemptes de produits polluants (ETMs, PAHs, *etc...*). Les études concernant les risques de l’utilisation de ces déchets anthropiques sont de plus en plus fréquentes, d’autant plus fréquentes qu’elles touchent la santé humaine (Bahri & Brissaud, 1996 ; Renoux *et al.*, 2001 ; Mohsen & Jaber, 2003 ; Lubello *et al.*, 2004 ; Lopez *et al.*, 2006 ; Salgot *et al.*, 2006 ; Huertas *et al.*, 2008 ; Fatta-Kassinos *et al.*, 2011...). C’est dans ce contexte de réutilisation des déchets d’activités humaines que j’ai été amenée à expérimenter le test de germination “laitue” sur un produit solide (des cendres), lors de mon stage à l’Ecole de Technologie Supérieure de Montréal au Québec. Classiquement, ce sont plutôt des tests de croissance qui sont utilisés pour tester les polluants solides. Néanmoins, leur durée (28 jours) était dans ce contexte particulier un handicap plutôt qu’un net avantage. Il a donc été convenu d’adapter le test de *germination* à la contrainte solide du matériau évalué. Les résultats présentés ne sont que des résultats préliminaires, qui ne traitent que de l’éventuelle toxicité des cendres et non des lixiviats. Ayant signé une clause de confidentialité, le nom et les détails des procédés d’incinération seront tus.

¹ Tout comme “*Phytoremediation*” ou “*Phytoextraction*” (*e.g.* Cloutier-Hurteau *et al.*, 2014).

3.1.2 Cendres & Procédés d'incinération

Les résidus solides (cendres ; [Figure II.4](#)) sont obtenus après gazéification (incinération à haute température) de déchets domestiques comme les plastiques, papiers, carton, résidus alimentaires...

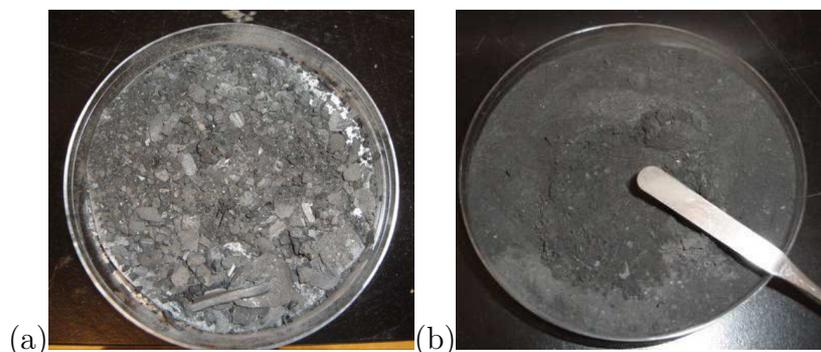


Figure II.4. Cendres brutes (a) et broyées (b) disposées dans une boîte de Pétri.

On note que ce système laisse intacts les métaux et le verre, la température étant insuffisante pour générer la fusion de ces déchets (mais évite ainsi l'émission de dioxines dans l'atmosphère). Le système en lui-même est un système en circuit fermé alors dimensionné pour de petites structures (hôpital, hôtel, navires...). Un des arguments de vente de l'appareil (notamment pour les hôtels) est la possible utilisation des résidus comme amendement des jardins voire des potagers. Des tests internes avaient été réalisés auparavant sur du radis *Raphanus sativus*, mais avec adjonction de terre et/ou compost (test de croissance) pouvant biaiser les résultats. J'ai donc réalisé un pool de tests "préliminaires", dans la mesure où le protocole du test de germination devait être adapté à la nature solide du rejet testé.

3.2 Matériel & Méthodes

3.2.1 Cendres

A l'instar des RITS, la composition (“recette”) des cendres dépend de l'activité journalière de l'industriel. Ici les cendres étaient composées comme suit (Figure II.5) :

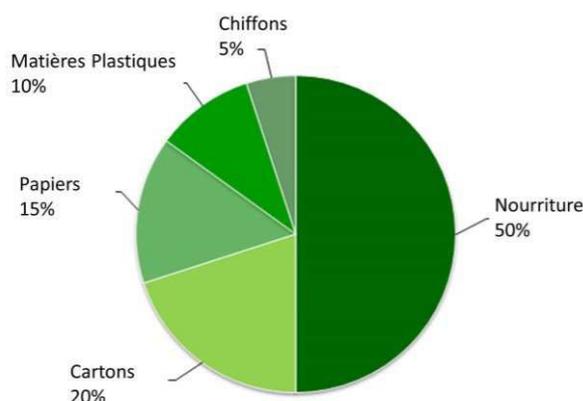


Figure II.5. Recette des cendres utilisées lors de cette étude préliminaire.

Des cendres “brutes” ont été récupérées. On entendra par “brutes”, les cendres non modifiées après incinération (broyage, mouillage...). Le broyage des cendres a été réalisé à la main à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate.

3.2.2 Semences

Les semences utilisées lors de ces expériences étaient de la variété « Regina d'estate », ou Reine de mai en français, qui est une laitue dite Pommée, tout comme la Batavia dorée de printemps, la Kinemontepas, la Grosse Blonde Paresseuse ou l'Appia. Les semences ont classiquement été conservées à l'abri de la chaleur, de l'humidité et de la lumière.

3.2.3 Protocoles

Les différents protocoles sont présentés et résumés dans le [Tableau II.15](#) suivant. Etant donnée la texture très hydrophobe des cendres, il m'a été impossible de réaliser une solution mère, puis des solutions filles à distribuer dans chaque boîte. C'est la raison pour laquelle une masse identique de cendres par triplicat a été déposée et répartie uniformément dans le fond de chaque boîte. Ce qui explique également

pourquoi le **Tableau II.15** présente bien des masses boîte⁻¹ et non des g L⁻¹. Un tableau de conversion est consultable en Annexes (**Tableau V.3**).

Tableau II.15. Synthèse des 4 expérimentations préliminaires concernant l'évaluation de l'écotoxicologie de résidus d'incinération solides *via* des tests de germination sur *L. sativa* var Regina d'estate.

Protocole	Cendres	Gamme de masses testées [g boîte ⁻¹]	Contact semences/cendres	Nomenclature
I1	broyées	condition 1 : 0,2	direct	C1
		condition 2 : 0,4		C2
I2	brutes	A recouvrement du fond de la boîte	direct	direct
			indirect*	indirect
II1 (figure V.4)	broyées	0,004 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1	direct	A à I
II2	broyées	0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,25	indirect*	A à D
	brutes			A' à D'

* cendres disposées entre 2 et 1 filtres (en sandwich) (volume ajusté au nombre de disques à 6 mL)

3.2.4 Statistiques

Les tests de germination ont été comparés *via* des tests de Chi² et les longueurs (racinaires et totales) *via* des tests de Tukey (p value < 0,05). Tous ces tests ont été réalisés avec le logiciel R (2.15.1) (R Development Core Team, 2013, www.r-project.org). Les courbes dose-réponses et les CE₅₀ ont été calculées selon le modèle de Hill *via* la macro Excel Regtox (EV 7.0.6).

3.3 Résultats

3.3.1 Germination

Les figures **Figure II.6** et **II.7** présentent les taux de germination des protocoles I1 et I2 (*cf.* **Tableau II.15**). Les GR des conditions 1 et 2 du premier protocole sont significativement différents du témoin (p values respectivement égales à 0,0058 et 0,002) mais pas différents entre eux ($p = 0,86$) : il n'y a pas de différence d'effet de germination entre. La conclusion est identique concernant le protocole I2. En effet, bien qu'inférieurs au témoin (GR= 93 % ; $p < 0,005$), les GR des semences mises en contact direct (53 %) ou indirect ($52 \pm 1,7$ %), avec des cendres brutes ne sont pas différents (p

= 1). La quantité, faible, et le mode de contact ne modifient donc pas l'effet, significatif, des cendres sur la germination des laitues.

La compilation des résultats des tests du protocole III1 et leur modélisation sous forme de courbe dose réponse (Figure II.8) permettent l'estimation de la CE_{50} de cendres broyées, en contact direct avec les semences. Le plateau de tolérance est très large : effets des cendres ne sont significatifs qu'à partir de masses supérieures à $0,6 \text{ boîte}^{-1}$ (soit 100 g L^{-1} ; traitements H et I ; $p < 0,001$). A nouveau, que les cendres soient brutes ou broyées, en contact indirect, les taux de germination des traitements ne sont pas différents du témoin (Figure II.9 ; $p > 0,05$), sauf le traitement D', à la fois différent du témoin ($p = 5,49.10^{-7}$) de de son traitement "miroir" D ($p = 0,00012$). On note qu'en contact indirect, les effets des cendres *broyées* s'observent plus tôt ($0,25 \text{ g}$ par boîte, équivalent à $62,5 \text{ g L}^{-1}$) qu'en contact direct (à des quantités de cendres inférieures ($0,6 \text{ boîte}^{-1}$, soit 100 g L^{-1}), il semble donc néanmoins avoir un effet du contact sur l'écotoxicité des cendres sur les semences de laitue.

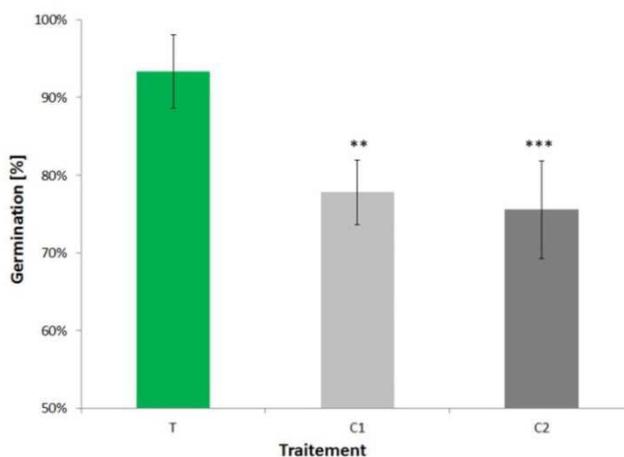


Figure II.6. Germination [%] de semences de laitue selon le traitement attribué : T, les témoins, C1 et C2, les conditions 1 et 2 ($0,2$ et $0,4 \text{ g}$ par boîte).

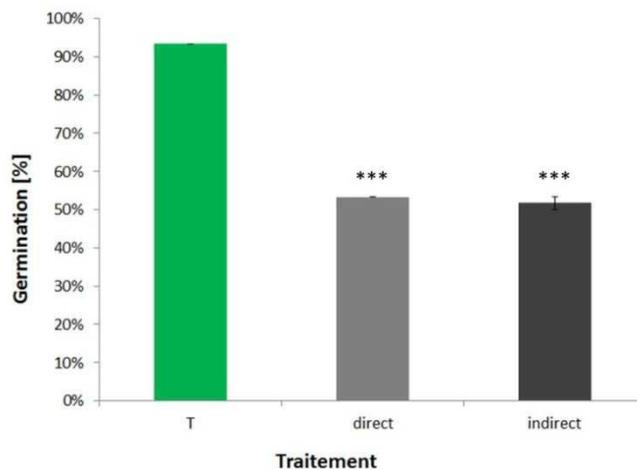


Figure II.7. Germination [%] de semences de laitue selon le traitement subi : T, les témoins, contacts direct et indirect des semences avec les cendres broyées.

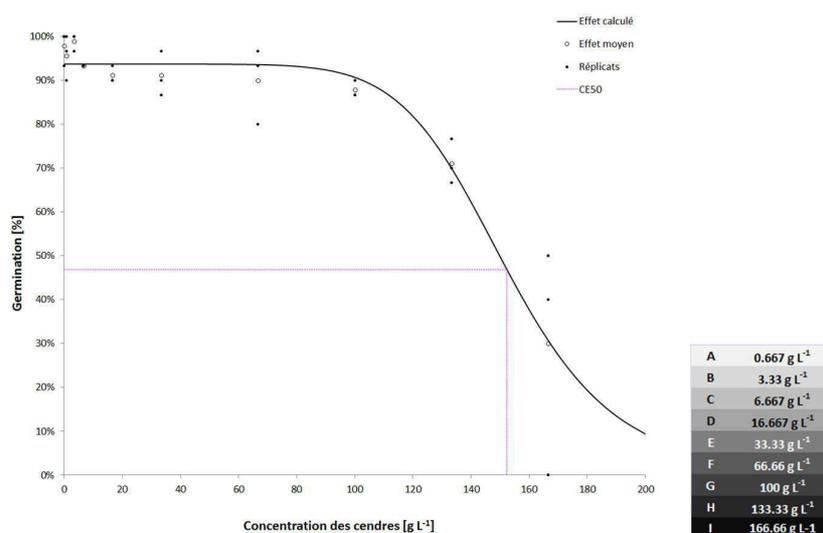


Figure II.8. Courbe dose réponse et CE_{50} ($152,38 \text{ g L}^{-1}$) des semences en contact direct avec les cendres.

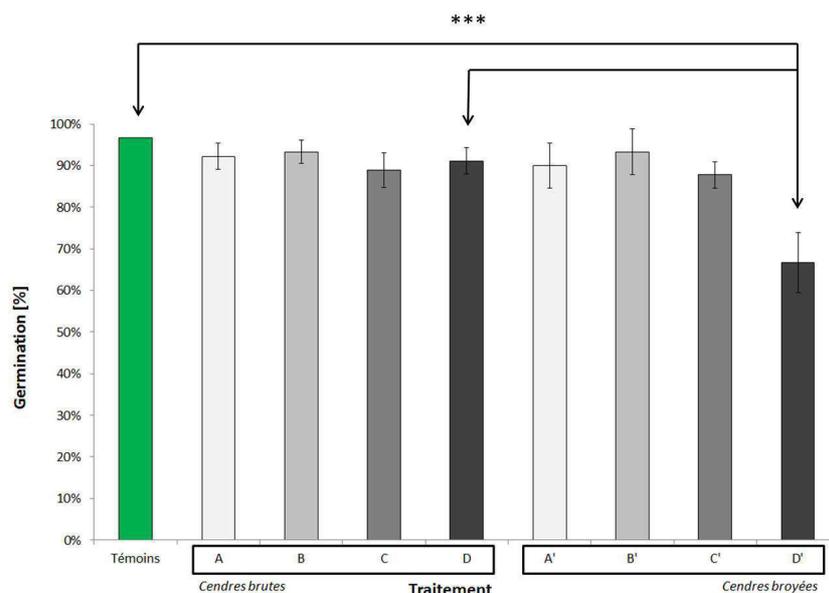


Figure II.9. Germination [%] de semences en contact indirect avec des cendres brutes ou broyées à certaines concentrations.

3.3.2 Elongation

Si l'on considère le ratio de la longueur racinaire RL avec la longueur totale TL (RL/TL), on remarque qu'il diminue, par rapport au témoin, significativement de la même façon que le GR pour les protocoles I1 et I2 (Figures II.10 et II.11 ; $RL/TL = 0,21$ et $0,22$ pour respectivement C1 et C2, $p < 2 \cdot 10^{-16}$; $RL/TL = 0,17$ et $0,22$ pour respectivement le contact direct et indirect, $p < 2 \cdot 10^{-16}$). Cette diminution reflète une diminution des longueurs racinaires.

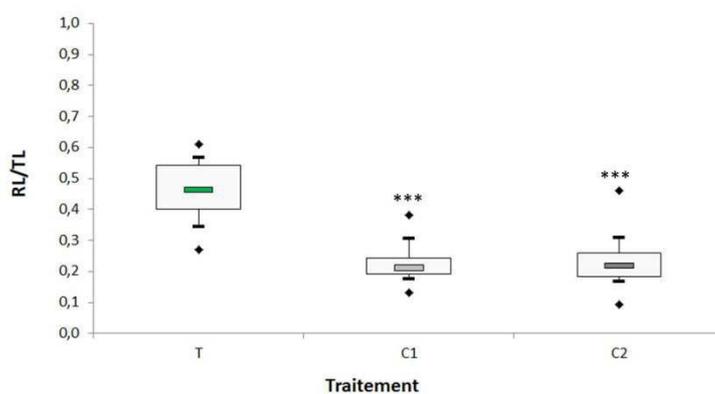


Figure II.10. Variations du rapport RL/RT selon le traitement subi par les semences : T, les témoins, C1 et C2, les conditions 1 et 2.

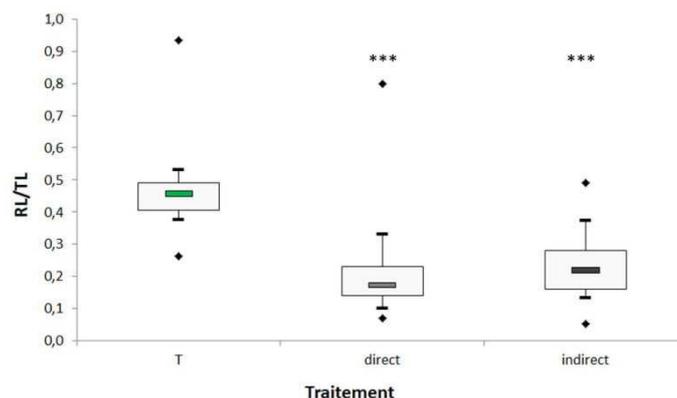


Figure II.11. Variations du rapport RL/RT selon le traitement subi par les semences : T, les témoins, direct et indirect le type de contact avec les cendres.

L'élongation, qu'elle soit racinaire ou totale, est une information subletale. C'est la raison pour laquelle, elle est plus fine et plus complexe à analyser : un polluant, un contaminant sans être mortel peut avoir des effets ! Si les taux de germination des différents traitements n'étaient pas différents du témoin avant les traitements H et I, il n'en est pas de même pour le ratio RL/RT (Figure II.11 et Tableau II.16). Il semble en effet que le traitement A, d'un point de vue germination et élongation, ne soit pas différent du témoin ($p = 0,44$). En revanche, le ratio de A (0,41) est différent de tous les autres traitements ($p < 10^{-5}$ voire 10^{-16}). A partir du traitement D, il semble que les effets des cendres sur l'élongation ne soient plus significativement différents *entre eux* : ils restent toujours différents du témoin.

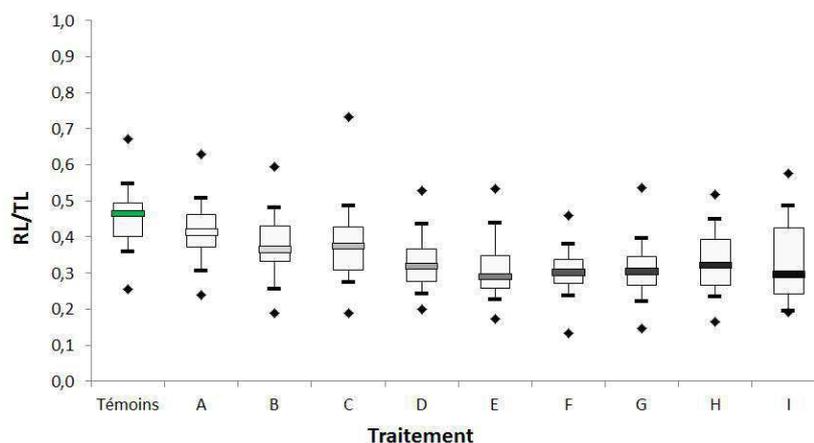


Figure II.12. Variations du rapport RL/RT selon le traitement subi par les semences : T, les témoins, A à I, les concentrations croissantes de cendres (cf. Tableau II.15).

Tableau II.16. Résultats des comparaisons des ratios des différents traitements du protocole III1 (Test de Tukey).

<i>p value</i>	Témoins	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Témoins		0,44				< 2.10 ⁻¹⁶				
A			8,7.10 ⁻⁵	1,57.10 ⁻⁵			< 2.10 ⁻¹⁶			
B				0,99	3,96.10 ⁻³	6,8.10 ⁻⁶	3.10 ⁻⁷	6,2.10 ⁻⁶	0,19	0,105
C					0,0138	3,8.10 ⁻⁵	2.10 ⁻⁶	3,53.10 ⁻⁵	0,053	0,188
D						0,945	0,673	0,934	1	1
E							0,999	1	0,898	0,999
F								0,999	0,588	0,979
G									0,881	0,999
H										0,99
I										

Pour la dernière série de tests, les rapports RL/RT de tous les traitements sont statistiquement différents du rapport témoin (pour le traitement A $p = 0,00267$; pour tous les autres traitements $p < 2.10^{-16}$). On remarque également que si RL/RT décroît au sein d'un type de traitement (cendres brutes ou broyées), les indices des traitements "miroir" ne sont pas différents (A/A' : $p = 0,05$; B/B' : $p = 0,97$; C/C' : $p = 0,36$; D/D' : $p = 0,53$).

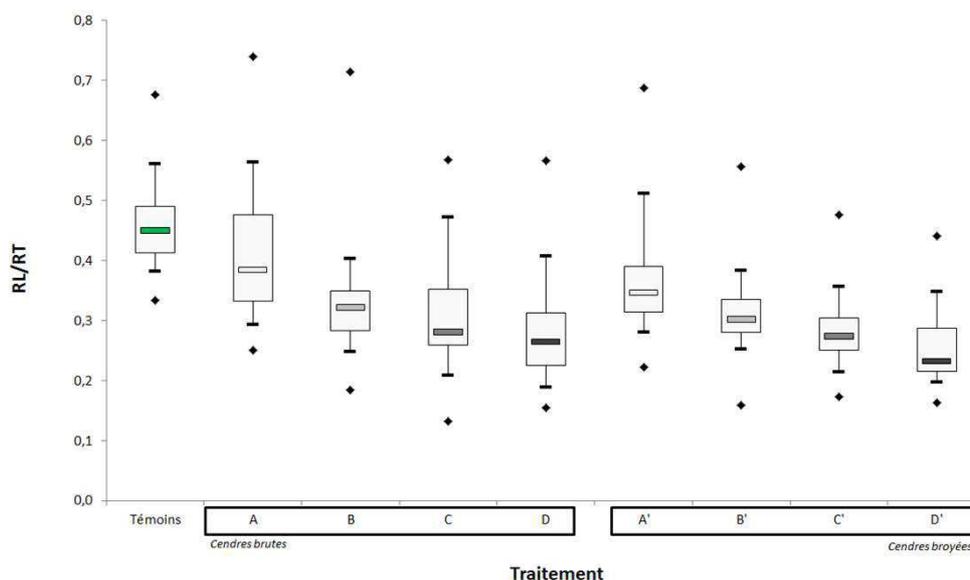


Figure II.13. Variations du rapport RL/RT selon le traitement subi par les semences.

3.3.3 Récapitulatif

Tableau II.17. Synthèse des résultats des tests préliminaires de germination opérés sur des cendres.

Protocole	I1	II1	I2	II2
<i>Etat cendres</i>	broyées	broyées	brutes	broyées/brutes
Traitement				
<i>contact</i>	direct	direct	direct/indirect	indirect
<i>concentrations</i>	2	gamme	à recouvrement	gamme
Germination	↘ 20 %	CE50 ~150 g L ⁻¹	↘ 40 %	↘ 10 à 20 %
RL/TL	↘ 50 %	↘ 30 %	↘ 45 %	↘ 45 %

3.4 Discussion & Conclusion

Particulièrement envisagé dans le domaine agricole (*cf.* Section II, Chapitre 2), l'amendement de substances polluées, quelle que soit leur nature (solide, liquide) ou leur degré de pollution, est un sérieux problème écologique, économique mais aussi sanitaire. Les conclusions des études menées à ce sujet sont d'ailleurs très souvent mesurées, les enjeux concernant la santé humaine étant trop importants, à court, moyen et long terme (*e.g.* Bahri & Brissaud, 1996 ; Al-Laham *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2005 ; Bixio *et al.*, 2006 ; Barbagallo *et al.*, 2011 ; Fatta-Kassinos *et al.*, 2011 ; Kalavrouziotis *et al.*, 2011 ; Jung *et al.*, 2014 ; Barbosa *et al.*, 2014).

En l'état actuel des expériences préliminaires menées ici, on peut dire que si l'état (broyé ou brut) des cendres importe peu, ces résidus ont néanmoins un effet sur non seulement la germination, mais aussi sur l'élongation des plantules, en particulier sur la longueur racinaire. Il paraît en revanche essentiel de souligner de possibles biais à ces tests exploratoires :

- L'hydrophobicité des cendres, broyées comme brutes, a rendu la mise en contact direct très compliqué à partir des concentrations les plus fortes ;
- Le principe du contact indirect ressemble plus au principe des tests d'évaluation de la toxicité de lixiviats.

4 ÉTUDE PRELIMINAIRE II : REGENERATION

4.1 Contexte : quid des semences non germées ?

Cela peut paraître trivial, mais les tests écotoxicologiques comme le test de germination peuvent se révéler être problématiques, dans la mesure où la germination peut être considérée comme un critère non léthal, par opposition aux tests ou les indicateurs meurent. Les semences végétales sont l'organe le plus résistant d'une plante, pouvant rester en dormance en attendant le retour de conditions environnementales plus propices à la germination (Vleeshouwers *et al.*, 1995 ; Khan *et al.*, 2001). Les réponses écotoxicologiques de la laitue dépendent, entre autres, de la composition du rejet, de la solution testée. Au cours de ce doctorat, si certains RITS étaient légèrement pollués, d'autres étaient particulièrement toxiques. Une question peut alors se poser : les semences non germées¹ étaient-elles *mortes* ? Cette étude préliminaire avait donc pour but de tester la capacité de régénération des semences, arrosées, et restées 7 jours en contact avec un RITS.

4.2 Matériel & Méthodes

4.2.1 Protocole

Le protocole présenté en Section I ([Figure II.12](#)) a subi de légères modifications pour cette étude. En effet, si la première partie du test reste classique, les semences arrosées avec du rejet non germées après 7 jours ont été replacées sur des disques de papier filtre neufs, dans des boîtes de Pétri neuves (15 par boîte), mises en contact avec uniquement de l'eau osmosée et remises 7 jours à l'obscurité.

¹ Ici les semences non germées sont les semences qui ne présentent aucune différence morphologique avec les semences avant le début du test.

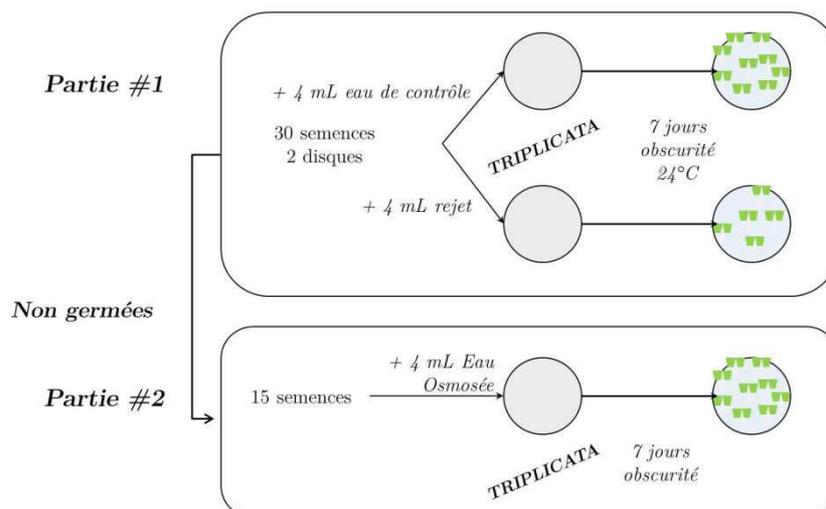


Figure II.14. Protocole de l'étude préliminaire II.

4.2.2 Rejet

La première partie du protocole (*cf.* Figure II.14) implique l'utilisation d'un RITS. L'analyse de ce rejet est présentée dans le [tableau suivant](#).

Tableau II.18. Analyse du RITS testé dans cette étude.

Paramètre / Substance	Valeur	Unité	Paramètre / Substance	Valeur	Unité
pH	8,2		DCO NF T 90-101	584	mg/L O2
Indice hydrocarbure	< 0,1	mg/L	MES filtre Millipore AP40	25	mg/L
Chrome	0,25	mg/L	Azote Kjeldahl	50,2	mg/L N
Chrome hexavalent	< 0,01	mg/L	Azote Global – calcul -	217	mg/L N
Cuivre	< 0,004	mg/L	Nitrates	663	mg/L NO3
Cyanures oxydables au chlore	< 0,02	mg/L	Nitrates exprimés en N	149,8	mg/L N
Fer	1,3	mg/L	Nitrites	57,1	mg/L NO2
Fluorures	0,35	mg/L	Nitrites exprimés en N	17,36	mg/L N
Nickel	0,64	mg/L	Phosphore total	0,16	mg/L P
Zinc	1,9	mg/L	Chlore libre	0,217	mg/L

4.2.3 Remarques

Les tests de germination ont été réalisés avec des semences de Batavia dorée de printemps. Seul le taux de germination GR a été calculé pour cette étude.

4.3 Résultats & Discussion

Dans un premier temps, il convient de considérer le taux de germination du rejet non dilué (Tableau II.19). Sa charge métallique était relativement faible (Tableau II.18), ce qui peut expliquer le taux de germination relativement élevé dans la mesure où l'on ne peut calculer aucune CE_{50} . On note que la différence avec les résultats témoins n'est pas largement significative puisque $p = 0,05$. Le rejet a eu un effet suffisant pour inhiber la germination de semence et permettre la réalisation de la partie 2 du protocole.

Tableau II.19. Résultats de germination des tests réalisés des parties 1 et 2 de l'étude.

Protocole	GR [%]
Partie 1	Témoins : 100
	Rejet pur : $68,88 \pm 12,57$
Partie 2	100 %

Intuitivement, on ne s'attend pas à voir les semences germer : “elles n'ont pas germé, elles sont *mortes*.” Si la résistance et la capacité de régénération des semences végétales est testée, vérifiée et particulièrement étudiée pour les espèces végétales halophytes et/ou soumises à des conditions environnementales et climatiques extrêmes (Ungar, 1962, 1978, 1982 ; Pujol *et al.*, 2000 ; Koorneef *et al.*, 2002 ; Nichols *et al.*, 2009 ; Ahmed & Khan, 2010), cette courte étude préliminaire montre que les semences de laitues “considèrent” la mise en contact avec un RITS comme des conditions hostiles. Une fois que ces conditions reviennent à la normale (contact avec de l'eau osmosée “propre”), la germination se déroule normalement (100 % de germination).

4.4 Conclusions & Perspectives

Il apparaît nécessaire de nuancer mon propos, et surtout les interprétations qui pourraient en découler. Ces résultats ne remettent en aucun cas en cause la pertinence et la validité de l'utilisation de semences végétales, *a fortiori* celles de laitues, lors de tests écotoxicologiques. Au même titre que les tests réalisés grâce à des indicateurs animaux ou microorganismes, le test “laitue” fournit une certaine gamme de résultats et d'informations qu'il faut manipuler et interpréter avec le recul nécessaire à tout diagnostic scientifique.

Un complément de recherche pourrait être réalisé en suivant le protocole présenté par la **Figure II.15** ci-dessous, tout en gardant à l'esprit la possibilité de réaliser ces tests sur différentes variétés de laitues. On pourrait également utiliser un autre RITS dans la partie 2.

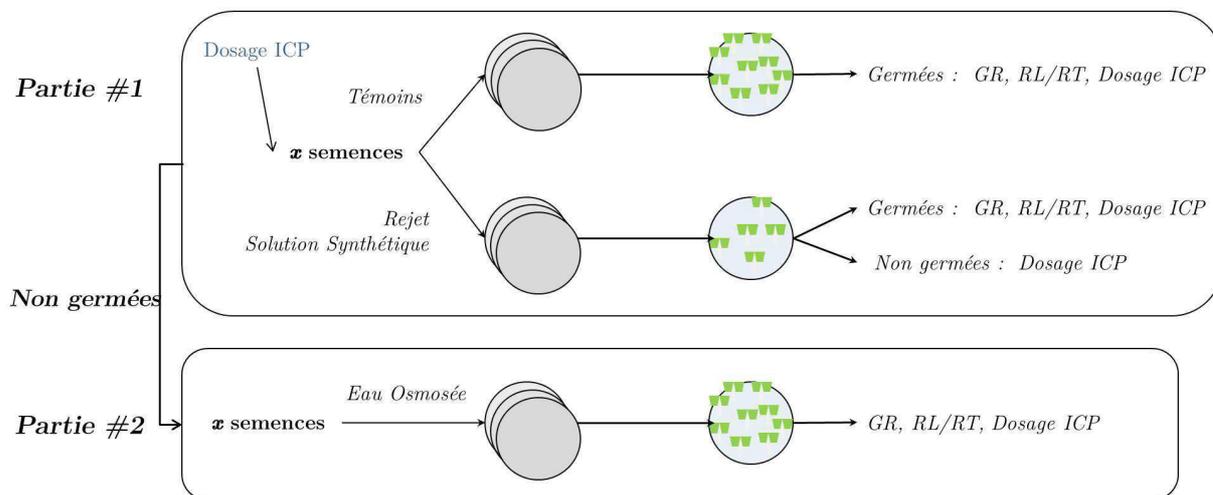
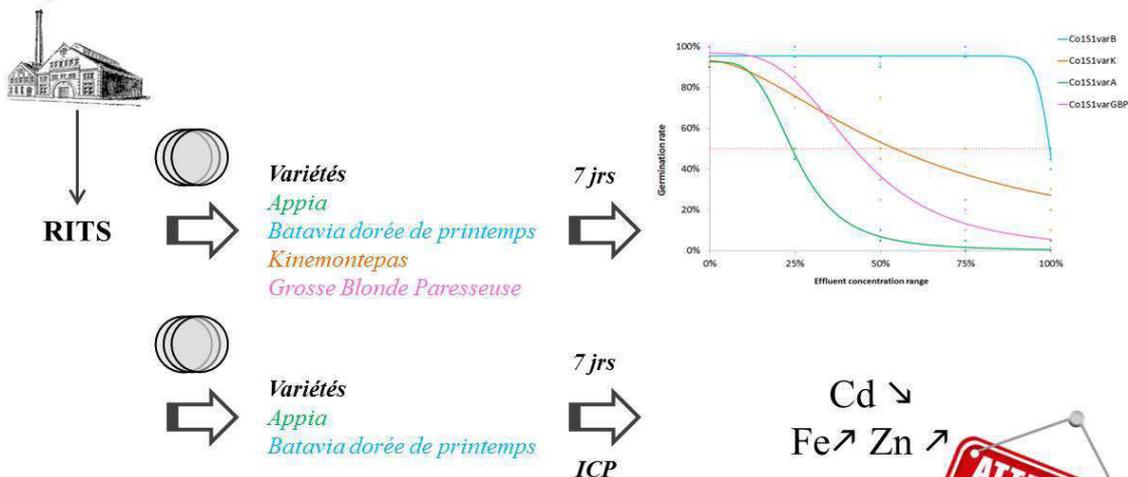


Figure II.15. Perspectives d'approfondissement de l'étude préliminaire II.

BILAN DE LA SECTION II

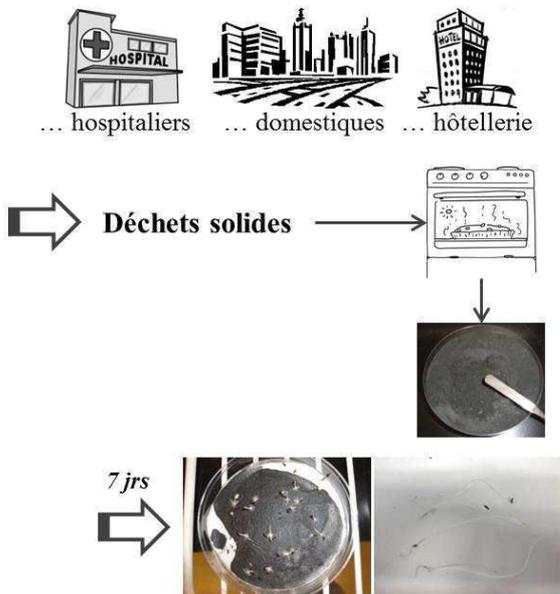
Chapitres 1 & 2



Conclusions

- Sensibilité différentielle (*du plus au moins résistant*)
 - GR: B > K > GBP > A
 - GI: B > K ~ GBP > A
- Tendances semblables mais Accumulation différentielle (*du plus au moins riche*)
 - A > B

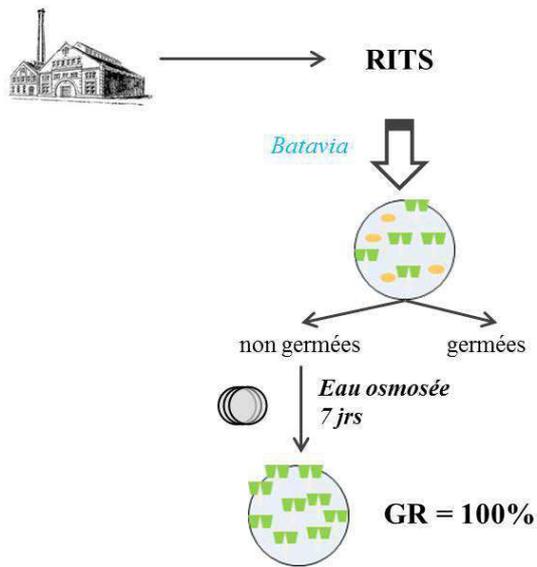
Chapitre 3



Conclusions

- $CE_{50} \sim 150 \text{ g L}^{-1}$
- Effets sur la germination et la longueur racinaire

Chapitre 4



Conclusion

- Très fort potentiel de régénération des semences de laitue

BIBLIOGRAPHIE¹

- Ahmed MZ, Khan MA.** 2010. Tolerance and recovery responses of playa halophytes to light, salinity and temperature stresses during seed germination. *Flora*, 205:764-771.
- Al-Lahham O, El Assi NM, Fayyad M.** 2003. Impact of treated wastewater irrigation on quality attributes and contamination of tomato fruit. *Agr Wat Manage*, 61:51-62.
- Alexander PD, Alloway BJ, Dourado AM.** 2006. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environ Pollut*, 144:736-745.
- Azizian A, Amin S, Maftoun M, Emam Y, Noshadi M.** 2011. Response of lettuce to Cd-enriched water and irrigation frequencies. *Afr J Environ Sci Technol*, 5:884-893.
- Bahri A, Brissaud F.** 1996. Wastewater reuse in Tunisia: assessing a national policy. *Water Sci Technol*, 33:87-94.
- Baker AJ.** 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nut*, 3:643-654.
- Barbagallo S, Cirelli GL, Indelicato S.** 2001. Wastewater reuse in Italy. *Water Sci Technol*, 43:43-50.
- Barbosa B, Costa J, Fernando AL, Papazoglou EG.** 2014. Wastewater reuse for fiber crops cultivation as a strategy to mitigate desertification. *Ind Crop Prod*, *In press*.
- Barrera-García A, O'Hara T, Galván-Magaña F, Méndez-Rodríguez LC, Castellini JM, Zenteno-Savín T.** 2012. Oxidative stress indicators and trace elements in the blue shark (*Prionace glauca*) off the east coast of the Mexican Pacific Ocean. *Comp Biochem Phys C*, 156:59-66.
- Bixio D, Thoeye C, De Koning J, Joksimovic D, Savic D, Wintgens T, Melin T.** 2006. Wastewater reuse in Europe. *Desalination*, 187:89-101.
- Blanck H.** 1984. Species dependent variation among aquatic organisms in their sensitivity to chemicals. *Ecol Bull*, 36:107-119.
- Blévin P, Tartu S, Angelier F, Leclaire S, Bustnes JO, Moe B, Herzke D, Gabrielsen GW, Chastel O.** 2014. Integument colouration in relation to persistent organic pollutants and body condition in arctic breeding black-legged kittiwakes (*Rissa tridactyla*). *Sci Total Environ*, 470:248-254.
- Brungs WA.** 1973. Effects of residual chlorine on aquatic life. *J Water Pollut Con F*, 45:2180-2193.
- Carravieri A, Cherel Y, Blévin P, Brault-Favrou M, Chastel O, Bustamante P.** 2014. Mercury exposure in a large subantarctic avian community. *Environ Pollut*, 190:51-57.
- Charles J, Sancey B, Morin-Crini N, Badot PM, Degiorgi F, Trunfio G, Crini G.** 2011. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. *Ecotoxicol Environ Saf*, 74:2057-2064.
- Chen Y, Wang C, Wang Z.** 2005. Residues and source identification of persistent organic pollutants in farmland soils irrigated by effluents from biological treatment plants. *Environ int*, 31:778-783.

¹ Cette partie regroupe les références bibliographiques citées dans cette section *hors* articles.

- Clemens S.** 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88:1707-1719.
- Cloutier-Hurteau B, Turmel MC, Mercier C, Courchesne.** 2014. The sequestration of trace elements by willow (*Salix purpurea*) – which soil properties favor uptake and accumulation? *Environ Sci Pollut Res*, 21:4759-4771.
- Di Salvatore M, Carafa AM, Carratù G.** 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73:1461-1646.
- Dutka BJ.** 1989. Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada.
- Fatta-Kassinos D, Kalavrouziotis IK, Koukoulakis PH, Vasquez MI.** 2011. The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *Sci Total Environ*, 409:3555-3563.
- Guo Q, Brown JH, Valone TJ, Kachman SD.** 2000. Constraints of seed size on plant distribution and abundance. *Ecology* 81:2149-2155.
- Haugland E, Brandsaeter LO.** 1996. Experiments on bioassay sensitivity in the study of allelopathy. *J Chem Ecol*, 22:1845-1859.
- Huertas E, Salgot M, Hollender J, Weber S, Dott W, Khan S, Schäfer A, Messalem R, Bis B, Aharoni A, Chikurel H.** 2008. Key objectives for water reuse concepts. *Desalination*, 218:120-131.
- John MK, van Laerhoven CJ.** 1976. Differential effects of cadmium on lettuce varieties. *Environ Pollut*, 10:163-173.
- Jung K, Jang T, Jeong H, Park S.** 2014. Assessment of growth and yield components of rice irrigated with reclaimed wastewater. *Agr Water Manage*, 138:17-25.
- Kalavrouziotis IK.** 2011. Basic principles of treated wastewater reuse planning in ecologically sensitive areas. *Water Air Soil Poll*, 221:159-168.
- Kennedy CD, Gonsalves FAN.** 1987. The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H⁺, efflux of excised roots. *J Exp Bot*, 38:800-817.
- Khan S, Khan NN.** 1983. Influence of lead and cadmium on the growth and nutrient concentration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and egg-plant (*Solanum melongena*). *Plant Soil*, 74:387-394.
- Koeppel DE.** 1977. The uptake, distribution, and effect of cadmium and lead in plants. *Sci Total Environ*, 7:197-206.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H.** 2002. Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol*, 5:33-36.
- Kranner I, Colville L.** 2011. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environ Exp Bot*, 72:93-105.
- Libralato G, Ghirardini Annamaria V, Francesco A.** 2010. How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73:1602-1611.
- Logan TJ, Lindsay BJ, Goins LE, Ryan JA.** 1997. Field assessment of sludge metal bioavailability to crops: Sludge rate response. *J Environ Qual*, 26:534-550.
- Lopez A, Pollice A, Lonigro A, Masi S, Palese AM, Cirelli GL, Toscano A, Passino R.** 2006. Agricultural wastewater reuse in southern Italy. *Desalination*, 187:323-334.

- Lubello C, Gori R, Nicese FP, Ferrini F.** 2004. Municipal-treated wastewater reuse for plant nurseries irrigation. *Water Res*, 38:2939-2947.
- Mahler RJ, Bingham FT, Page AL.** 1978. Cadmium-enriched sewage sludge application to acid and calcareous soils: Effect on yield and cadmium uptake by lettuce and chard. *J Environ Qual*, 7:274-281.
- Malinga M, Szefer P, Gabrielsen GW.** 2010. Age, sex and spatial dependent variations in heavy metals levels in the Glaucous Gulls (*Larus hyperboreus*) from the Bjørnøya and Jan Mayen, Arctic. *Environ Monit Assess*, 169:407-416.
- Mapanda F, Mangwayana EN, Nyamangara J, Giller KE.** 2005. The effect of long-term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. *Agr Ecosyst Environ*, 107:151-165.
- Mattsson B, Cederberg C, Blix L.** 2000. Agricultural land use in life cycle assessment (LCA): case studies of three vegetable oil crops. *J Clean Prod*, 8:283-292.
- Miller WE, Peterson SA, Greene JC, Callahan CA.** 1985. Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites. *J Environ Qual*, 14:569-574.
- Mohsen MS, Jaber JO.** 2003. Potential of industrial wastewater reuse. *Desalination*, 152:281-289.
- Moïse JA, Han S, Gudynaite-Savitch L, Johnson DA, Miki BL.** 2005. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *Cell Dev Biol-Plant*, 41:620-644.
- Nan Z, Li J, Zhang J, Cheng G.** 2002. Cadmium and zinc interactions and their transfer in soil-crop system under actual field conditions. *Sci Total Environ*, 285:187-195.
- Pablos MV, Fernández C, del Mar Babín M, María Navas J, Carbonell G, Martini F, García-Hortigüela P, Vicente Tarazona, J.** 2009. Use of a novel battery of bioassays for the biological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicol Environ Saf*, 72:1594-1600.
- Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Féraud JF, Grand C, Bispo A.** 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci Total Environ*, 363:114-125.
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A.** 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot*, 52:199-223.
- Pujol JA, Calvo JF, Ramirez-Diaz L.** 2000. Recovery of germination from different osmotic conditions by four halophytes from southeastern Spain. *Ann Bot-London*, 85:279-286.
- Ramos R, González-Solís J, Forero MG, Moreno R, Gómez-Díaz E, Ruiz X, Hobson KA.** 2009. The influence of breeding colony and sex on mercury, selenium and lead levels and carbon and nitrogen stable isotope signatures in summer and winter feathers of *Calonectris* shearwaters. *Oecologia*, 159:345-354.
- Raskin I, Kumar PBA, Dushenkov S, Salt DE.** 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr Opin Biotech* 5:285-290.
- Renoux AY, Tyagi RD, Samson R.** 2001. Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. *Water Res* 35:1415-1424.
- Repetto G, Jos A, Hazen MJ, Molero ML, Del Peso A, Salguero M, del Castillo P, Rodríguez-Vicente, Repetto M.** 2001. A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. *Toxicol in Vitro*, 15:503-509.

- Salgot M, Huertas E, Weber S, Dott W, Hollender J.** 2006. Wastewater reuse and risk: definition of key objectives. *Desalination*, 187:29-40.
- Semenzin E, Temminghoff EJ, Marcomini A.** 2007. Improving ecological risk assessment by including bioavailability into species sensitivity distributions: An example for plants exposed to nickel in soil. *Environ Pollut*, 148:642-647.
- Seregin IV, Kozhevnikova AD.** 2005. Physiological role of nickel and its effects on higher plants. *Russian J Plant Physiol*, 53:257-277.
- Siedlecka A.** 1995. Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Soc Botanicorum Poloniae*, 64:265-272.
- Sloff W, Canton JH, Hermens JLM.** 1983. Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (Sub)acute toxicity tests. *Aquat Toxicol*, 4:113-128.
- Ungar IA.** 1962. Influence of salinity on seed germination in succulent halophytes. *Ecology*, 43:763-764.
- Ungar IA.** 1978. Halophyte seed germination. *Bot Rev*, 44:233-264.
- Ungar IA.** 1982. Germination ecology of halophytes. *In Contributions to the Ecology of Halophytes*. Sen DN, Rajpurohit KS (Eds.), Springer, Netherlands, 143-154.
- Vazquez-Montiel O, Horan NJ, Mara DD.** 1996. Management of domestic wastewater for reuse in irrigation. *Wat Sci Tech*, 33:355-362.
- Vleeshouwers LM, Bouwmeester HJ, Karszen CM.** 1995. Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *J. Ecol*, 83: 1031-1037.
- Wang W, Freemark K.** 1995. The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 30:289-301.
- Wängberg SÅ, Bergström B, Blanck H, Svanberg O.** 1995. The relative sensitivity and sensitivity patterns of short-term toxicity tests applied to industrial wastewaters. *Environ Toxicol Water Qual*, 10:81-90.
- Weidenhamer JD, Morton TC, Romeo JT.** 1987. Solution volume and seed number: often overlooked factors in allelopathic bioassays. *J Chem Ecol*, 13:1481-1491.
- White EP, Ernest SKM, Kerkhoff AJ, Enquist BJ.** 2007. Relationships between body size and abundance in ecology. *Trends Ecol Evol*, 22:323-330.
- Woodward G, Ebenman B, Emmerson M, Montoya JM, Olesen JM, Valido A, Warren PH.** 2005. Body size in ecological networks. *Trends Ecol Evol*, 20:402-409.
- Zhou Q, Wu Y, Xiong X.** 1994. Compound pollution of Cd and Zn and its ecological effect on rice plant. *Chin J Appl Ecol*, 5:428-441 (in Chinese).
- Zorrig W, El Khouni A, Ghnaya T, Davidian JC, Abdelly C, Berthomieu P.** 2013. Lettuce (*lactuca sativa*) : a species with with a high capacity for cadmium (Cd) accumulation and growth stimulation in the presence of low Cd concentrations. *J Horti Sci Biotech*, 88:783-789.

*III. SOLUTIONS SYNTHETIQUES
MONO- & POLY- CONTAMINEES*

III. Solutions Synthétiques Mono- & Poly- Contaminées.....	135
1 Solutions Monométalliques	139
1.1 Matériel & Méthodes	140
1.1.1 Tests de germination	140
1.1.2 Solutions métalliques.....	140
1.2 Résultats & Discussion	141
1.3 Conclusion & Perspectives.....	143
2 Mélanges Polymétalliques.....	145
2.1 Contexte	145
2.2 Article accepté par J Pollut Eff Cont.....	146
2.2.1 Introduction.....	147
2.2.2 Materials and methods	148
2.2.3 Results and discussion.....	149
2.2.4 Conclusions.....	152
2.2.5 References.....	152
2.3 Conclusions & Perspectives	155
3 “Ecotoxicoresponsable”.....	157
3.1 Métaux & Molécules organiques	158
3.1.1 Matériel et Méthodes.....	160
3.1.2 Résultats & Discussion.....	161
3.1.3 Conclusions & Perspectives.....	163
3.2 Article accepté par Arab J Chem	164
3.2.1 Introduction.....	165
3.2.2 Overview of alkylphenols as emerging pollutants.....	166
3.2.3 APs in water, wastewater and industrial discharge water	171
3.2.4 APs limination by existing wastewater treatment systems.....	173
3.2.5 APs elimination from wastewaters and water.....	174

3.2.6 Concluding and personal remarks	193
3.2.7 References.....	199
3.3 Conclusions & Perspectives	208
Bilan de la Section III.....	209
Bibliographie.....	210

SOLUTIONS SYNTHÉTIQUES

L'évaluation de l'écotoxicité d'un RI en général, RITS en particulier, ne se limite pas au test du rejet seulement (pur ou dilué). Il est également important d'identifier clairement les principaux responsables de la toxicité du mélange afin de redoubler les efforts d'amélioration des procédés (*e.g.* optimisation du fonctionnement des bains) et de traitement des effluents, en aval du relargage en milieu naturel. Etudier et définir les métaux à abattre s'opère en plusieurs étapes :

- définir l'écotoxicité individuelle, ou *single toxicity*¹, de chaque métal via le calcul de CE₅₀ de solutions synthétiques monométalliques (aux concentrations *de facto* irréalistes) ;
- générer, puis tester, des solutions synthétiques de plus en plus complexes, à concentration de rejet (mimes, aux concentrations réalistes) ;
- modéliser les comportements éventuels des ETMs entre eux *via* des modèles d'**additivité**, d'antagonisme, d'indépendance d'action *etc* (*cf.* Thèse de J. Charles, 2012).

Cette partie du manuscrit traite des tests de germination réalisés sur des solutions synthétiques :

- monométalliques, et de la définition de CE50 pour douze ETMs (Chapitre 1) ;
- polymétalliques, et la comparaison de leurs réponses écotoxicologiques avec celles de rejets purs (Chapitre 2) ; et également
- polycontaminées par des ETMs et des molécules organiques (Chapitre 3).

¹ Ou encore *single tox*

1 SOLUTIONS MONOMETALLIQUES

« *Rien est poison, tout est poison, seule la dose fait le poison* ». J'ai déjà évoqué les ETMs (Section I, Chapitre 2) : ces éléments, qu'ils soient ETM_{pt} ou ETM_{ss}, n'échappent pas à la règle et sont intrinsèquement toxiques. La question qui subsiste est "à partir de quel point, quelle dose, quelle concentration, un ETM est-il toxique ?". Si les CE₅₀ de produits polluants sur certains organismes sont très largement documentés (*e.g. Daphnia magna*), pour d'autres indicateurs biologiques, pourtant couramment utilisés en écotoxicologie (*e.g. Gammarus pulex, Lactuca sativa*), il persiste de nombreuses lacunes, notamment pour les ETMs (Charles, 2012). C'est dans ce but que les expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées, afin de 1/ définir la CE₅₀ de quatorze ETMs, et 2/ classer ces ETMs selon leur phytotoxicité.

Des résultats antérieurs par Manet (2007¹) puis Sancey (2011²) ont démontré et/ou confirmé l'importance des contre-ions dans certaines réactions chimiques et biochimiques (*e.g.* formation de micelles) et leurs conséquences écotoxicologiques (*e.g.* réponses écotoxicologiques). Qu'est-ce qu'un contre-ion ? D'après *l'International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC* (Everett, 1972), un contre-ion est « *un ion de masse moléculaire faible et de charge opposée à la charge de l'ion central* ». Citons comme exemple, la toute simple molécule du sel, aussi connue sous le nom de chlorure de sodium. L'ion central, le sodium Na, est chargé positivement : Na⁺. Le sodium s'associe avec un contre-ion, ici le chlorure, de charge opposée, Cl⁻, ce qui génère un complexe équilibré. Il existe de très nombreux contre-ions, de taille, de charge et de forme différentes : hydroxyde, sulfate, formiate, chlorure, bromure, acétate, chlorure, propionate, nitrate *etc.* Les résultats des tests de germination de solutions synthétiques de différents contre-ions du cuivre et du nickel seront également présentés dans ce chapitre.

¹ Dans ses travaux de doctorat, S. Manet démontre l'effet du contre-ion sur les propriétés physico-chimiques de tensioactifs (amphiphiles) cationiques dimériques.

² Dans ses travaux de doctorat, B. Sancey confirme l'écotoxicité différentielle de contre-ions (sulfate et nitrate), expérimentalement et bibliographiquement en reportant les travaux de Verlière & Heller (1981) et Mohanapriya (2006).

1.1 Matériel & Méthodes

1.1.1 Tests de germination

Les tests de germination ont été réalisés sur des semences de Batavia dorée de printemps, *classiquement*, sans adaptation particulière (Section I, Point 3.3.1.).

1.1.2 Solutions métalliques

Toutes les solutions ont été réalisées à partir de réactifs de laboratoire, en poudre, « conformes à la pharmacopée européenne », dissouts dans de l'eau osmosée. Le pH des solutions a ensuite été ajusté entre 5,5 et 9,5. Le [Tableau III.1](#) reporte les différents contre-ions du cuivre et du nickel utilisés et testés. Le [Tableau III.2](#), quant à lui, présente les quatorze ETMs (plus bore et fluorure) testés.

Tableau III.1. Gamme de concentrations de cuivre et de nickel, sous différentes formes, en solutions synthétiques, testées lors de bio-essais de *L. sativa* (var B).

Elément	Contre-ion	Formule	Gamme de concentration [mg L ⁻¹]
Cuivre	Acétate	CH ₃ COO ⁻	
	Chlorure	Cl ⁻	0*-50-100-150-200-250-300
	Sulfate	SO ₄ ²⁻	
Nickel	Chlorure	Cl ⁻	
	Nitrate	NO ₃ ⁻	0*-50-100-150-200-250-300
	Sulfate	SO ₄ ²⁻	

* la concentration "zéro" correspond aux témoins

Tableau III.2. Gammes de concentrations de 12 ETMs différents, en solutions synthétiques monométalliques, testées lors d'essais écotoxicologiques de *L. sativa* (var B).

Elément	Concentration [mg L ⁻¹]	Elément	Concentration [mg L ⁻¹]
Ag	0-10-25-50-75-100-150-200-250-300	F	0-25-50-62,5-75-87,5
Al	0-10-25-50-75-100-150-200-250-300	Fe	0-10-50-100-500-1000-2000-5000
B	0-25-50-75-100-150-200-300-400	Mn	0-10-50-100-500-1000-2000-5000
Cd	0-100-200-250-300-350-400-450-500-550-650-800-1000	Ni	0-50-100-150-200-250-300
Co	0-10-50-100-200-300-500-750-1000	Pb*	0-10-20-30-40
Cr	0-10-20-50-100-200-300	Sn	0-10-25-50-75-100-150-200-250-300
Cu	0-50-100-150-200-250-300	Zn	0-50-100-150-200-250-300-350-400

* la solubilité du sulfate de plomb est de 42,5 mg L⁻¹. C'est pourquoi la concentration de la solution mère n'est pas supérieure à cette valeur

1.2 Résultats & Discussion

La Figure III.1 présente les différentes CE_{50} calculées à partir des résultats des tests de germination lancés sur les solutions synthétiques mentionnées dans le Tableau III.1.

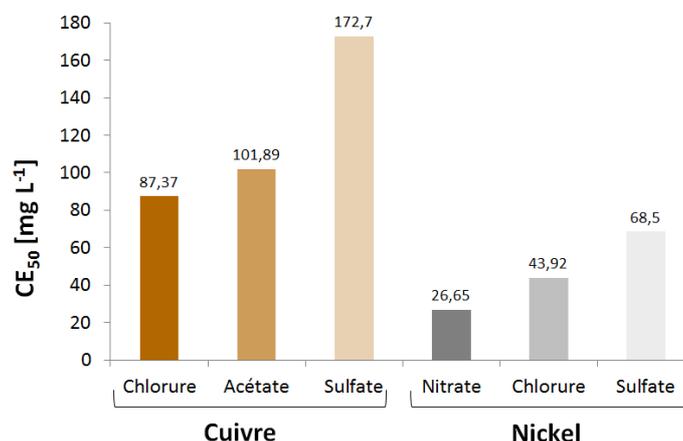


Figure III.1. CE_{50} s croissantes du cuivre et du nickel, respectivement sous forme chlorure, acétate, sulfate, et nitrate, chlorure et sulfate.

Ces résultats permettent de classer les contre-ions testés en fonction de leur effet croissant sur l'évaluation de l'écotoxicité des deux métaux testés :

- pour le cuivre : chlorure > acétate > sulfate ;
- pour le nickel : nitrate > chlorure > sulfate.

Ces ordres de toxicité des contre-ions sont similaires aux ordres trouvés par Sancey (2011). Afin d'éviter "d'ajouter" de la toxicité aux métaux testés par le choix d'un contre-ion plus toxique, par la suite *tous* les métaux utilisés en solution synthétique (mono- et poly-contaminées) seront sous la forme la moins toxique. Ainsi, les ETMs testés dans ce chapitre (Tableau III.2) sont sous forme sulfate SO_4^{2-} . Les résultats des tests de germination des solutions métalliques à base de ces ETMs sont récapitulés dans le tableau suivant (Tableau III.3).

Tableau III.3. CE_{50} de 14 ETMs, testés sous leur forme sulfate, en solutions synthétiques monocontaminées sur *L. sativa* var Batavia dorée de printemps.¹

Elément	CE_{50} [mg L ⁻¹]	Elément	CE_{50} [mg L ⁻¹]
Ag	37,5 (pH 5,5) ; 52,9 (pH 8,5)	F	75,5
Al	237	Fe	496,6
B	151,8	Mn	<i>n.d.</i>
Cd	64,37	Ni	68,5
Co	240,5	Pb	<i>n.d.</i>
Cr	264	Sn	26,7 (pH 5,5)
Cu	172,7	Zn	46,5

n.d. : non déterminé

Si les ordres de classement des écotoxicités des contre-ions sont similaires avec de précédents travaux, les ordres de grandeurs et de classement des CE_{50} des ions (centraux) métalliques étudiés dans ce chapitre sont très différents des résultats “référents”, comme représenté dans la [figure suivante](#).

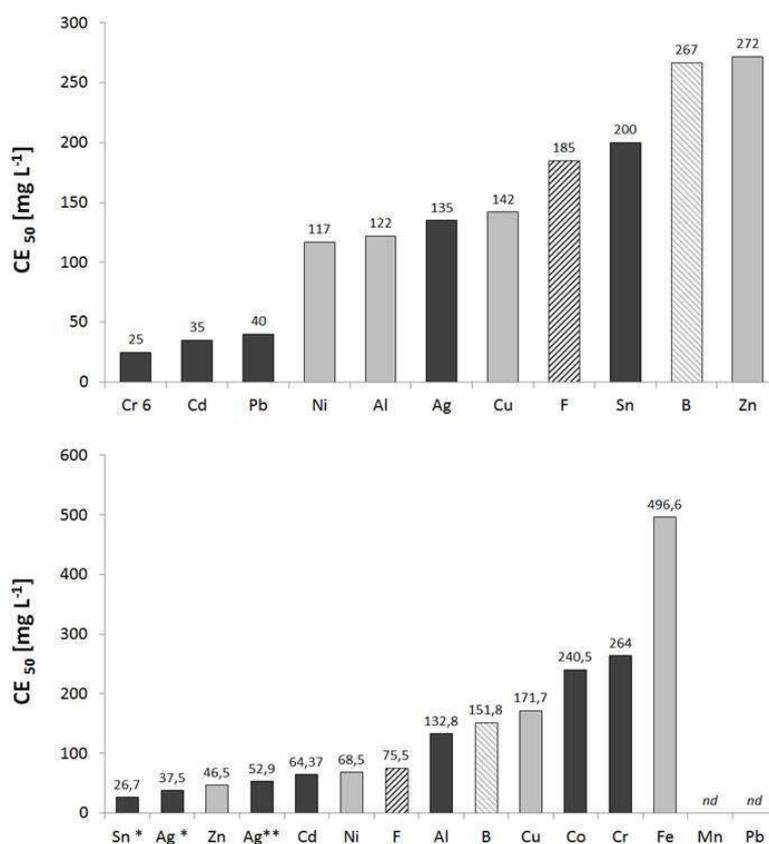


Figure III.2. Classement d'ETMs (ETMpt en gris ; ETMss en noir) sous forme sulfate selon leur CE_{50} (haut : Sancey, 2011 ; bas : cette étude).

¹ Les CE_{50} présentées dans ce tableau sont exprimées en mg de l'élément testé par litre de solution.

Ces différences s'expliquent principalement par la "lecture" des semences. Les critères de définition d'une semence germée (quand ils sont mentionnés) varient d'une référence bibliographique à l'autre (Wang & Keturi, 1990 ; Arauja *et al.*, 2001 ; Fjällborg & Gustafsson, 2006 ; Di Salvatore *et al.*, 2008 ; Young *et al.*, 2011) dans la mesure où il ne s'agit pas d'une germination au sens physiologique du terme, la germination "vraie", invisible sans dissection, débutant dans le péricarpe. Ces critères (en général, de taille) à nouveau doivent être particulièrement bien définis¹ afin de ne laisser aucun doute possible quant au statut "germée" ou "non germée" de la semence à l'expérimentateur. Cette observation est sûrement triviale, mais des différences de critères (*e.g.* une semence germée mesure au moins 3 ou 5 mm) et/ou d'interprétation de la part du lecteur peuvent avoir d'importantes conséquences sur le diagnostic écotoxicologique global du produit testé.

1.3 Conclusion & Perspectives

Les ETMs testés n'ont donc pas les mêmes valeurs de CE_{50} , qu'ils soient ETMpt ou ETMss. Si cette conclusion est intuitivement prévisible², le classement de ces ETMs selon l'évaluation de leur toxicité individuelle par la laitue ne l'est pas pour autant. L'ordre ici défini, du plus au moins toxique :

- Sn, Ag, Zn, Ag, Cd, Ni, F, Al, B, Cu, Co, Cr, Fe,
est différent de celui défini par Sancey (2011) :
- Cr, Cd, Pb, Ni, Al, Ag, Cu, F, Sn, B, Zn.

On a vu que les critères de lecture et l'expérimentateur peuvent être à l'origine de ces différences. Soulevons également un point chimico-mathématique incontournable, qui est pourtant parfois oublié : la **stœchiométrie** et ses fameux rapports. Prenons par exemple le plomb : le sulfate et le nitrate de plomb ne sont pas deux formes légèrement différentes du plomb. Ces deux produits ont des propriétés physico-chimiques différentes comme la température de fusion (respectivement 1087°C et 269,85°C), la solubilité dans l'eau (42,5 mg L⁻¹ contre 520 g L⁻¹) ou encore la masse molaire (303,3 g mol⁻¹ et 331,2 g mol⁻¹). Cette dernière caractéristique est particulièrement importante et génératrice d'erreurs de calculs de concentrations des solutions synthétiques dites

¹ D'autant plus qu'ils ne sont fixés nulle part.

² « Rien ne s'obtient sans computation, même la plus extraordinaire des intuitions. »
Edgar Morin (1921-), sociologue et philosophe français.

“mères”. Nous avons dans *toutes* nos expériences impliquant des solutions synthétiques, mono- ou poly-métalliques, veillé à exprimer les concentrations en fonction de l’élément métallique testé et non pas en fonction du complexe ETM et contre-ion. Ainsi, une solution mère de sulfate de plomb ne contient que 68,31 % de plomb. La nuance peut paraître ténue, mais encore, les conséquences en termes de diagnostic environnemental peuvent être importantes.

On a vu précédemment (Section II, Chapitres 2 et 3) que la variété de laitue utilisée lors d’un test de germination importait énormément sur l’évaluation finale (GR, GI, RL et RT) de l’écotoxicité d’un rejet industriel. Nous avons réalisé d’autres tests en parallèle de l’évaluation de la toxicité de RITS, afin de pouvoir comparer l’écotoxicité de certains ETMs en solution synthétique sur la Batavia avec la GBP. Les résultats sont présentés dans le [tableau suivant](#).

Tableau III.4. CE₅₀s de 5 ETMs, testés en solutions synthétiques monocontaminées sur *L. sativa vars B* et GBP.

	Elément	Batavia dorée de printemps	Grosse Blonde Paresseuse	<i>p value</i> *
CE ₅₀ [mg L ⁻¹]	Al	237 ± 4	190,5 ± 3	0,0079
	Co	240,5 ± 4	281 ± 72	0,158
	Cr III	264 ± 23	226 ± 9	0,00791
	Ni	58,3 ± 14	63,5 ± 5	0,4206
	Zn	154,3 ± 32	219,5 ± 41	0,01582

* d’après un test de Wilcoxon

Les valeurs de CE₅₀ de l’Al, du Cr et du Zn sont significativement différentes. L’ordre de toxicité est également différent (les valeurs sont présentées dans l’ordre décroissant) :

- Batavia : Ni, Zn, Al, Co, CrIII ;
- Grosse Blonde Paresseuse : Ni, Al, Zn, CrIII, Co.

Les différences de sensibilités, germination, élongation et accumulation, mises en évidence précédemment sur des *rejets complexes* semblent être également observables pour des *solutions synthétiques*. De futurs travaux pourraient être entrepris afin de :

- compléter la liste des ETMs testés ;
- tester les réponses de plusieurs autres variétés ;
- doser les plantules.

2 MÉLANGES POLYMÉTALLIQUES

2.1 Contexte

Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont permis de montrer la diversité des toxicités des ETMs, en solutions synthétiques *mono-contaminées*. Comme tout élément chimique, ils interagissent avec leur environnement : on peut alors observer des phénomènes d'antagonisme, de **synergie** *etc.* C'est la raison pour laquelle connaître les *single toxicities* des ETMs n'est pas suffisant : il faut également créer des solutions plus complexes, tendre à mimer les concentrations réelles mesurées dans les échantillons de RITS, et évaluer les *mixture toxicities*. L'article qui suit présente les résultats des expériences menées en ce sens, avec la particularité d'avoir testé la sensibilité de la laitue *Lactuca sativa* ainsi que celle d'un crustacé dulçaquicole la daphnie *Daphnia magna* (dans le cadre de l'application de la DCE).

2.2 Article in press par J Pollut Eff Cont¹

“Ecotoxicity evaluation of industrial discharge waters and metallic solutions using two organisms (*Lactuca sativa* and *Daphnia magna*)”.

Authors : Anne Priac, Amandine Poupenev, Coline Druart, Grégorio Crini.

Abstract :

Surface treatment industrial discharge water is a complex anthropogenic source of pollutants, including organic pollutants (PAHs, VOCs...) and numerous metal ions. We attempted to identify the main toxicants comparing impact assessment of real polycontaminated effluents and reconstituted polymetallic solutions via ecotoxicological bioassays performed with *Daphnia magna* immobilization test (24 h) and *Lactuca sativa* germination test (168 h). We focused first on 2 (Ni and Zn) then on 5 metals (Ni, Zn, Co, Cr, Al). Our results showed differences between metal toxicity order: Zn>Al>Ni>Cr~Co, for daphnids and Ni>Zn>Al~Co>Cr for lettuce. However, discharge waters remained more toxic than synthetic solutions: those 5 metals were not entirely responsible for the discharge water ecotoxicity. We also found *D. magna* to be more sensitive than *L. sativa*. This last assessment should be interpreted with care, knowing that immobilization and germination tests are respectively acute and chronic toxicity bioassays. Thus, battery tests are appropriate to evaluate industrial discharge water samples, and should be increasingly used as ecotoxicological standards.

DOI : 10.4172/2375-4397.1000117.

¹ Journal of Pollution Effects & Control <http://esciencecentral.org/journals/pollution-and-effects.php>

2.2.1 Introduction

Industrial discharge waters, especially those from the surface treatment (ST) industry, released into the aquatic ecosystems have their own set of various environmental and sanitary issues, due to the fact that various loads of hazardous substances including: metallic trace elements (MTE; mostly Zn, Ni, Cu, Cr, Sn and Al), organic matter (oils, solvents, etc. and diverse organics such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and volatile organic compounds (VOCs) [1]. ST industries are, like other industrial sectors, subject to specific release regulations, notably for metals. Although the discharge waters usually respect the regulatory standards, metals the present could be assimilated by fauna and flora and thus lead to long term toxic effects on the environment [2, 3]. Nowadays, while pollutant mixtures present in discharge water after treatment are relatively easy to characterize chemically, assessing their impact on the environment is usually difficult and has rarely been reported [4]. Finally, the toxicity of treated ST waste remains poorly defined.

To assess the biological and chemical quality of water, 4 main kinds of approach can be used: (1) chemical analysis to characterize the water mass studied qualitatively and quantitatively, (2) comparing the analytical data to ecotoxicological information available in the literature to reach an *a priori* assessment of the hazard of substances (as in Draft Assessment Reports for pesticides), (3) laboratory bioassays to assess the toxicity of substances and (4), *in situ* studies using native organisms or *via* active bioindication to assess the risk of natural populations exposed to substances released in the environment. Laboratory bioassays for

water quality assessment are numerous and offer a large choice of indicators [5-7]. Three different types of standardized bioassays are the most commonly used, notably for the regulatory framework for chemicals management. They represent 3 trophic levels: primary producers with algae, primary consumers with crustaceans and secondary consumers with fish. Among them, the short-term bioassay based on the immobilization of a freshwater crustacean, *Daphnia magna*, is a test also used in the ecotoxicological assessment of industrial discharge waters. Nevertheless, it was pointed out that toxicity strongly relies on the choice of bioindicators and the endpoints used in the bioassays since sensitivity varies among taxonomic groups and species [8-10]. Consequently, it may be very useful to assess discharge water thanks to various bio-indicators in order to increase the ecological representativeness, to include a panel of sensitivity and to avoid a major risk of environmental effects and toxicity underestimation [11, 12]. Recently, phytotoxicity tests using plants such as *Lactuca sativa* have been also proposed to assess the impact of industrial effluents by our group for the first time [3]. Our results demonstrated that these tests were simple, quick and reliable. Moreover, the use of these bioassays also presented the advantage of being inexpensive and not requiring major equipment as also reported in other works [8, 10, 13]. However, these tests were mainly used to assess the toxicity of single substances, such as metals (Table III.5) and there is a lack of studies concerning the impact of complex matrices such as discharge waters [29] or synthetic solutions of several metals.

The aim of this work was to assess the environmental impact of industrial discharge waters poly-contaminated with metals and to determine which metal(s) is

(are) most responsible for the toxicity *magna* and *Lactuca sativa* via reconstituted through the use of 2 bio-indicators *Daphnia* solutions.

Table III.5. Toxicities of metallic trace elements (published data) on different organisms (*Lactuca sativa*, *Daphnia magna*, *Pseudoskirkneriella subcapitata* and *Gammarus pulex* or *sp.*)

Element	Bioassay indicator	Index	Endpoint	Concentration [mg L ⁻¹]	Reference
Zn	<i>L.sativa</i> (var <i>n.r.</i>)	96h EC ₅₀	Root elongation	1	[14]
	<i>P.subcapitata</i>	72h EC ₅₀	Growth rate	0.042	[15]
	<i>D.magna</i>	48h LC ₅₀	Death	0.970	[16]
	<i>G.pulex</i>	48h LC ₅₀	Death	4.920	[17]
Ni	<i>L.sativa</i> (var <i>Tro.</i>)	NOEC	Growth rate	1.8	[10]
	<i>P.subcapitata</i>	96h EC ₅₀	Population	0.233	[18]
	<i>D.magna</i>	48h LC ₅₀	<i>n.r.</i>	6.9	[19]
	<i>G.sp</i>	96h LC ₅₀	<i>n.r.</i>	13	[20]
Cr	<i>L.sativa</i> (var <i>Rav.</i>)	72h EC ₅₀	Growth rate	5.9	[21]
	<i>P.subcapitata</i>	72h EC ₅₀	Population	0.030	[22]
	<i>D.magna</i>	48h LC ₅₀	Immobilization	0.290	[23]
	<i>G.pulex</i>	48h LC ₅₀	Death	0.809	[24]
Co	<i>D.magna</i>	48h LC ₅₀	Death	4.4	[25]
Al	<i>D.magna</i>	48h LC ₅₀	Immobilization	3.9	[26]
Cu	<i>L.sativa</i> (var <i>n.r.</i>)	96h EC ₅₀	Root elongation	3	[14]
	<i>P.subcapitata</i>	72h EC ₅₀	Growth rate	0.020	[15]
	<i>D.magna</i>	48h LC ₅₀	Death	0.0111	[27]
	<i>G.pulex</i>	48h LC ₅₀	Death	0.047	[28]

Specific lettuce varieties: *n.r.*, non reported; *Tro.*, Trocadero; *Rav.*, Ravel

End-points: LC₅₀, lethal concentration for 50% of the individuals tested; NOEC, no observed effect concentration

2.2.2 Materials and methods

2.2.2.1 Toxicity bioassays

Standardized germination tests [30] were performed following the method previously described in detail by Charles *et al.* [3]. The test assessed the germination of 30 plump lettuce seeds (*Lactuca sativa* (L.) var *Batavia Dorée de printemps*) watered with Reverse Osmosis Water ROW (controls; pH = 6 ± 0.2), Discharge Water DW or Synthetic Solution SS, in triplicates, for 7 days, in the dark at 24 ± 1°C, on a filter paper substrate. As recommended by the standard, DW or SS pH must be between 5.5 and 9. To validate the test,

germination rates (GR) of controls must be higher than or equal to 90%.

Bioassays using *Daphnia magna* were carried out by an accredited analysis laboratory (CARSO, Lyon, France). The test was performed according to the “Inhibition Protocol Mobility” described in the standardized biomonitoring test ISO [31].

2.2.2.2 Industrial discharge waters & Synthetic solutions

Five DW (denoted DW1 to DW5) were firstly collected in a ST company in Franche-Comté over a one-year period. Effluents were average sample characteristic of that day’s activity As the 2 main issues to be dealt with in DWs were Ni and Zn

(specific company threshold emission values for these 2 MTE were 3.5 mg L^{-1}), DW5 Ni and Zn concentrations were mimicked in single and binary solutions S: S1 (Zn = 2 mg L^{-1}), S2 (Ni = 0.5 mg L^{-1}) and S3 (Zn = 2 mg L^{-1} and Ni = 0.5 mg L^{-1}). Each solution ecotoxicity was evaluated with germination test. We also determined Ni and Zn EC_{50} (concentrations range: 0 to 300 mg L^{-1}) for *L.sativa* and *D.magna*.

Four others DWs (DW6 to DW9) were then collected in the same company. Ni, Zn, Al, Cr and Co concentrations of these DWs were mimicked in mixture SS denoted SS6 to SS9. Each solution ecotoxicity was evaluated with germination and immobilization test (Table III.6). We also determined Al, Co and Cr EC_{50} (concentrations range: 0 to 1000 mg L^{-1}) for *L.sativa* and *D.magna*.

For each of these 9 DWs, EC_{50} (expressed in percentage of DW) was determined through lettuce germination and daphnids immobilization tests. DWs samples were diluted with ROW. Every metallic synthetic solutions were prepared in ROW from sulfate salts of Al, Co, Cr, Ni and Zn (purchased from Fisher Scientific, France).

2.2.2.3 Chemical analyses

For each DW sample and synthetic solution, pH was determined (pH meter, model 3110, WTW, Alès, France). Metal concentrations were measured by spectrophotometry (cuvette test and/or reagent tests; portable Spectroflex 6100, WTW®, Alès, France) or by ICP-AES (ThermoFisher, iCAP 6500 radial model, Courtaboeuf, France) after acid digestion for DWs, following a previously reported method [1]. All results are expressed in mg L^{-1} .

2.2.2.4 Statistical analysis

Germination rates of control, DW5, S1, S2 and S3 were compared using the Kruskal-Wallis test, with a significance threshold of $p < 0.05$. All statistical analyses were performed with R (2.15.1) (R Development Core Team, 2013). Dose-dependent curves and EC_{50} values were calculated with Hill's model using the macro Excel Regtox free version EV 7.0.6.

2.2.3 Results and discussion

The toxicity of the first 5 DWs was studied through 2 bio-indicators (Table III.6). The results showed deleterious effects on both bio-indicators since EC_{50} were low for daphnids (below 32%) and lettuce seed germination rates were significantly lower than those of controls ($>90\%$). Due to activities of the industry focused on in our study, investigations of toxicity were firstly led on Ni and Zn. Concentrations of both these suspected toxicants are presented in Table III.6 and showed daily variability (as previously reported by Charles *et al.* [3]). From an analytical point of view, the chemical composition in Ni and Zn can be ranked as follows: DW3 > DW5 > DW1 ~ DW 4 > DW2. For the 2 bioassays, the sample toxicity range (decreasing order) was DW2 > DW4 > DW1 > DW3 > DW5 for *D. magna* and DW3 > DW5 > DW4 > DW1 > DW2 for *L. sativa*. The more toxic DWs for *D. magna* were the less toxic for *L. sativa*. This was also confirmed by Castillo *et al.* [32] studying the impact of final tannery industrial effluent (daphnids EC_{50} 24h = 77.9%) and lettuce (EC_{50} -root growth 120h > 90%). Despite its low coefficient of variation CV (14%), it appeared that lettuce DW toxicity could be linked to Ni and Zn concentrations (except for DW4 and DW1 which were inverted). For daphnids, no correlation was shown (CV=59%). This

variability was explained by the production activity, as suggested by Hitchcock *et al.* [33] who calculated a CV reaching 133.7% for the mortality of nematodes exposed to industrial effluents (pulp and paper industries).

Table III.6. Ecotoxicity (EC₅₀ and GR) of different discharge water samples (DW1 to DW5) on *Daphnia magna* and *Lactuca sativa* respectively in relation to Zn and Ni concentrations

Sample	Concentrations [mg L ⁻¹]		EC ₅₀ [% of DW]	Germination (%)
	Ni	Zn	<i>D. magna</i>	<i>L. sativa</i>
DW1	0.34	1.91	17	54
DW2	0.28	1.51	5.2	58
DW3	0.54	2.46	21	42
DW4	0.35	1.84	11.3	48
DW5	0.51	2.06	32	44

Every control GR was higher than the required 90% of seed germination

To verify the hypothesis that Ni and Zn concentrations in the DW can be linked to lettuce ecotoxicological response, we ran germination tests on synthetic solutions S1, S2 and S3 containing Ni and Zn, alone or in a mixture, in the same concentrations as those found in DW5. We also performed ecotoxicological tests on both *D. magna* and *L. sativa* (Table III.7), to assess individual EC₅₀ of nickel and zinc.

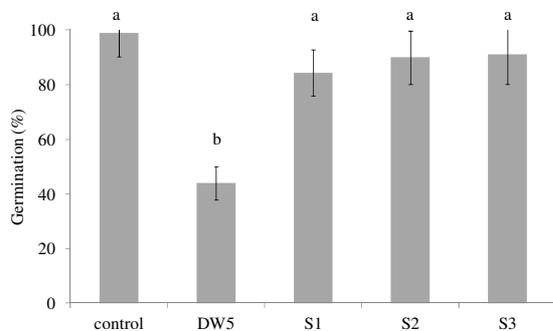


Figure III.3. Germination (%) of *L. sativa* seeds for the DW5 sample and synthetic solutions S1, S2 and S3. Different letters

indicated significant differences (*p*-value <0.01).

The results showed that GR of single (S1 and S2) and binary (S3) synthetic solutions were not significantly different from the control (Figure III.3). This result was not surprising in regard to the values of EC₅₀ determined in *L. sativa* for Ni and Zn (Table III.7) which were far above the concentrations found in DWs. However, the EC₅₀ results were not expected considering those found in the literature (Table III.5). Indeed, toxicity values for other endpoints were much lower, of the order of 1 mg L⁻¹, both for Zn and Ni [10]. This major disparity could be explained by the variety of lettuce used for the assay, as criticized by Priac *et al.* (unpublished work) who demonstrated that among 4 varieties, Batavia (used in the present paper) was the least sensitive. Significant differences were found between the germination rates of lettuce exposed to synthetic solutions of Zn and Ni and those exposed to the DWs at same concentrations (Figure III.3). Similar experiments and interpretations were reported by Yoo *et al.* [34] with Cu, Ag and cyanides, to reproduce an effluent from a lead frame manufacturing factory. Unlike our results, those of Yoo *et al.* [34] demonstrated that these 3 substances were responsible for the toxicity of the effluent on daphnids since they observed a similarity in the toxicity of the real and the synthetic effluents. In the present study, the DW toxicity observed on *L. sativa* was not explained only by the presence and the concentrations in Zn and Ni.

Table III.7. EC₅₀ values for daphnia and lettuce for 5 MTE detected in DW samples ICP-AES analysis (Al, Co, Cr, Ni and Zn).

Bio- indicator	EC ₅₀ [mg L ⁻¹]				
	Al	Co	Cr	Ni	Zn

<i>D. magna</i>	8.45	11.69	10.36	9.8	6.35
<i>L. sativa</i>	237	247.7	265	58.3	154.3

Investigations were conducted on a larger number of metals potentially responsible for the toxicity of DWs. Among 23 elements measured, 15 were present at quantifiable levels at least once, and 5 of them (Al, Co, Cr, Ni and Zn) were selected for the following experiments owing to their concentrations in DW6 to DW9 (higher than 1 mg L⁻¹; Table III.8) and/or their known effects on the environment (Table III.5). DWs 6, 7 and 9 appeared to be much more toxic (EC₅₀ 6.1, 5, 18.4 % of the

Table III.8. Concentrations of 5 metals (mg L⁻¹) in 4 discharge waters (DW6 to 9) and synthetic solutions (SS6 to 9) in relation to toxicity on *D. magna* and *L. sativa* (EC₅₀ in % of DW or SS)

Sample	Metal ion [mg L ⁻¹]					EC ₅₀ [% of DW or SS]	
	Al	Co	Cr	Ni	Zn	<i>D. magna</i>	<i>L. sativa</i>
DW6	5.09	2.75	0.15	0.62	2.67	6.1	45
SS6	5.06	2.72	0.15	0.63	2.69	56.8	86
DW7	5.70	4.05	0.35	0.74	1.97	5	68
SS7	5.58	4.06	0.24	0.70	1.96	52.1	84
DW8	2.66	1.69	0.24	0.31	1.45	ND	66
SS8	3.64	2.28	0.29	0.32	1.49	72.2	84
DW9	5.36	3.58	0.25	0.40	2.05	18.4	68
SS9	5.26	3.71	0.26	0.41	2.79	47.9	86

ND: not determined

To our knowledge, few studies have assessed the environmental impact of discharge water or synthetic solutions on more than one bio-indicator [7, 12, 14, 35, 36]. Bioassay batteries have already been shown to be a relevant way to evaluate toxicity, irrespective of the ecosystem studied [7, 36, 37]. Sensitivity differences observed between daphnids and lettuce (Table III.6, 7 et 8) also occurred on comparison with data from the literature (Table III.5). General differences can be explained by bioassay endpoint (acute or chronic toxicities) or protocol variability (bioindicator subspecies or cultivars, animal gender, lapse of exposure, number of

sample) than their respective SS (56.8, 52.1, 47.9 % of the solution tested) on *D. magna*. Results showed the same tendency for the GR of *L. sativa*, but not as dramatic: for instance daphnid EC₅₀ values were 5 and 52.1% for DW7 and SS7, respectively, whereas lettuce EC₅₀ values were 68 and 84%. Like for Ni and Zn, the presence of Al, Co and Cr did not explain all the DW toxicity on both *D. magna* and *L. sativa*, even though daphnid EC₅₀ values showed these 5 metals to be toxic (Table III.7).

individuals per Petri dish or tube, etc.; [38]). Yet, it appears that differences between bioindicator sensitivity remain in bibliographic data. For 3 metals for which we found comparative results (Zn, Ni, Cr), toxicity ranges were different for lettuce (Zn<Ni<<Cr) compared to algae, daphnids and gammarids (Cr<Zn<<Ni) as described in Table III.5. Table III.8 also shows single EC₅₀ differences between indicators: toxicity range for daphnids being (from less to more toxic) Cr, Ni and Zn while the lettuce toxicity range was Cr, Zn and Ni. Another difference between these 2 bioindicators was related to the order of magnitude of the

EC₅₀ (e.g. lettuce nickel EC₅₀: 58.3 mg L⁻¹ vs daphnids: 9.8 mg L⁻¹).

2.2.4 Conclusions

In this study, the 2 bioindicators *Lactuca sativa* and *Daphnia magna* were proved to be pertinent to assess the ecotoxicity of polycontaminated discharge water from the surface treatment industry. The results showed that metal-based synthetic single and mixed solutions were less toxic than the discharge water, meaning that the ecotoxicity of these effluents could not be explained only by the 5 metals chosen in this work. Consequently, it would be interesting to lead future investigations not only towards a more exhaustive determination of the chemical composition of discharge water but also possible interactions (e.g. additivity, antagonism, synergy) between metals and/or trace organics and/or other minerals. Results also demonstrated that lettuce was more resistant than daphnids to the discharge waters and synthetic solutions. Ecotoxicological assessments complete chemical analyses as they integrate all chemical interactions. As reported in this study the use of a battery of tests was a relevant tool to include the whole variability of toxicity.

Acknowledgments

The authors are grateful to *Ville de Besançon* which funded Anne Priac's PhD, to Sophie Gavaille and Céline Lagarrigue from the *Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse*, the *Conseil Régional de Franche-Comté*, and the FEDER (*Fonds Européens de Développement Régional*) for financial support (NIRHOFEX Program 2013-2016).

2.2.5 References

1. Morin-Crini N, Druart C, Gavaille S, Lagarrigue C, Crini G (2013) Analytical monitoring of the chemicals present in the

discharge water generated by the surface treatment Industry. *J Environ Protect* 4: 53-60.

2. Komjarova I, Blust R (2009) Effect of Na, Ca and pH on simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the water flea *Daphnia magna* measured using stable isotopes. *Aquatic Toxicol* 94: 81-86.
3. Charles J, Sancey B, Morin-Crini N, Badot PM, Degiorgi F, et al (2011) Evaluation of the ecotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. *Ecotox Environ Saf* 74: 2057-2064.
4. Kadirova ZC, Hojamberdiev M, Katsumata KI, Isobe T, Matsushita N, et al (2014) Photodegradation of gaseous acetaldehyde and methylene blue in aqueous solution with titanium dioxide-loaded activated carbon fiber polymer materials and aquatic plant ecotoxicity tests. *Environ Sci Pollut R* 21: 4309-4319.
5. Cairns JJ, Pratt JR (1989) The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia* 188/189: 5-20.
6. Farré M, Barceló D (2003) Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trac-Trend Anal Chem* 22: 299-310.
7. Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, et al (2006) Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci Total Environ* 363: 114-125.
8. Wang W, Freemark K (1995) The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 30: 289-301.
9. Wangberg SA, Bergström B, Blanck H, Svanberg O (1995) The relative sensitivity and sensitivity patterns of short-term toxicity tests applied to industrial waste water. *Environ Toxic Water* 10: 81-90.
10. Di Salvatore M, Carafa AM, Carratu G (2008) Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere* 73: 1461-1464.

11. Chapman PM, Fairbrother A, Brown D (1998) A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 17: 99-108
12. Hernando MD, Fernandez-Alba AR, Tauler R, Barcelo D (2005) Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65: 358-366.
13. Dutka BJ (1989) Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute NWRI, Environment Canada.
14. Fjällborg B, Li B, Nilsson E, Dave G (2006) Toxicity identification evaluation of five metals performed with two organisms (*Daphnia magna* and *Lactuca sativa*). *Arch Environ Contam Toxicol* 50: 196-204.
15. Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A (2009) Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ* 407: 1461-1468.
16. Gale NL, Wixson BG, Erten M (1992) An evaluation of the acute toxicity of lead, zinc and cadmium in Missouri Ozark groundwater. *Trace Subst Environ Health* 25: 169-183.
17. McLoughlin N, Yin D, Maltby L, Wood RM, Yu H (2000) Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environ Toxicol Chem* 19: 2085-2092.
18. Chen CY, Lin KC, Yang DT (1997) Comparison of relative toxicity relationships based on batch and continuous algal toxicity tests. *Chemosphere* 35: 1959-1965.
19. Cabezek I, Stasiak M (1960) Investigation on the influence of some metals on the biocoenosis of water with the use of *Daphnia magna* as an indicator (Part I). *Roczn Zabl Hig Warsaw* 11: 303-312.
20. Rehwoldt R, Lasko L, Shaw C, Wirhowski E (1973) The acute toxicity of some heavy metals ions toward benthic organisms. *Bull Environ Contam Toxicol* 10: 291-294.
21. Adema DMM, Henzen L (1989) A comparison of plant toxicities of some industrial chemicals in soil culture and soilless cultures. *Ecotoxicol Environ Saf* 18: 219-229.
22. Nyholm N (1990) Expression of results from growth-inhibition toxicity tests with algae. *Arch Environ Contam Toxicol* 19: 518-522.
23. Diamantino TC, Guilhermino L, Almeida MF, Soares AMVM (2000) Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests. *Ecotoxicol Environ Saf* 45: 253-259.
24. EPA (1993) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms (EPA/600/4-90/02TF), US Environmental Protection Agency; Office of Toxic Substances: Washington, D.C.
25. EPA (1975) Methods for acute toxicity test with fish, macroinvertebrates and amphibians (EPA/660/3-75-009), US Environmental Protection Agency; Office of Toxic Substances: Washington, D.C.
26. Biesinger KE, Christensen GM (1972) Effects of various metals on the survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *J Fish Res Board Can* 29: 1691-1700.
27. Long KE, Van Genderen EJ, Klaine SJ (2004) The effects of low hardness and pH on copper toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 23: 72-75.
28. Taylor EJ, Maund SJ, Pascoe D (1991) Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: diptera) and *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea: amphipoda). *Arch Environ Contam Toxicol* 21: 371-376.
29. Backhaus T, Altenburger R, Arrhenius Å, Blanck H, Faust M, et al (2003) The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. *Cont Shelf Res* 23: 1757-1769.
30. ISO (2005) Soil Quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Screening test for emergence of lettuce

- seedlings (*Lactuca sativa* L.). International Organisation for Standardization ISO 17126. Geneva, Switzerland.
31. ISO (1989) Water Quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Acute Toxicity Assay. International Organisation for Standardization ISO 6341. Geneva, Switzerland.
 32. Hitchcock DR, Black HC, Williams PL (1997) Investigations into using the nematode *Caenorhabditis elegans* for municipal and industrial wastewater toxicity testing. *Arch Environ Contam Toxicol* 33: 252-260.
 33. Castillo GC, Vila IC, Neild E (2000) Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environ Toxicol* 15: 370-375.
 34. Yoo J, Kim SB, Kim WK, Jung J (2014) Toxicity identification of effluent from a semiconductor lead frame manufacturing factory. *J In Eng Chem* 20: 494-498.
 35. Bohorquez-Echeverry P, Campos-Pinilla C (2007) Assessment of *Lactuca sativa* and *Selenastrum capricornotum* like indicators of water toxicity. *Universitas Scientiarum* 12: 83-98.
 36. Wilke BM, Riepert F, Koch C, Kühne T (2008) Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotox Environ Saf* 70: 283-293.
 37. Ewell WS, Gorsuch JW, Kringler RO, Robillard KA, Spiegel RC (1986) Simultaneous evaluation of the acute effects of chemicals on seven aquatic species. *Environ Toxicol Chem* 5: 831-840.
 38. Alexander PD, Alloway BJ, Dourado AM (2006) Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environ Pollut* 144: 736-745.

2.3 Conclusions & Perspectives

Les RITS sont complexes et variables. La connaissance de leurs effets *globaux* est importante principalement pour les industriels, les gestionnaires et les législateurs. La connaissance et la compréhension des effets individuels, mais aussi en mélange de plus en plus complexes, des éléments qui composent ces rejets, intéressent surtout le chercheur. Pour notre équipe en particulier, l'enjeu est double puisque ces informations :

- permettent d'optimiser, en collaboration étroite avec nos partenaires industriels, les procédés de traitement physicochimiques des effluents en station (*cf.* Sancey, 2011 ; Charles, 2012). L'amélioration de ces procédés a un double, voire triple avantage : chimique (et donc financier) en abattant les quantités de polluants plus efficacement, et environnemental en diminuant la charge polluante des rejets ;
- ajoutent aux bases de données écotoxicologiques déjà constituées, et affinent tests après tests les connaissances et compréhension du sujet (effets létaux, sub létaux ; interactions des ETMs entre eux, avec des molécules organiques etc. ; *e.g.* Weltje, 1998).

Malgré les contraintes techniques¹ inhérentes à la réalisation de tels tests, poursuivre l'augmentation de la complexité des solutions mimes de RITS, dans cette étude il n'y a au maximum que 5 métaux en présence, répondrait parfaitement aux problématiques environnementales, industrielles et de recherche actuelles.

Le laboratoire Chrono-Environnement réalise également des tests écotoxicologiques sur *Cantareus aspersus* à différents stades de développement (*e.g.* Druart *et al.*, 2010 ; Druart *et al.*, 2012). Surtout utilisé dans des études de génotoxicité (*e.g.* Fritsch *et al.*, 2011 ; Pauget *et al.*, 2011 ; Baurand *et al.*, 2013), il serait plus qu'intéressant d'étudier les effets de RITS sur cet escargot terrestre (à différents stades de développement).

¹ Chaque composé d'un rejet (métallique ou organique) a ses propres propriétés physico-chimiques : au plus le nombre "d'ingrédients" d'une solution augmente, au plus les contraintes sont nombreuses.

Les RITS sont des cocktails de polluants métalliques ET organiques. Si la gestion (consommation, abatement chimique...) des métaux est une priorité pour les industriels, il en est de même pour les molécules organiques. D'autant plus qu'il n'est pas raisonnable de tenir pour seuls responsables de l'écotoxicité des rejets les éléments métalliques présents. L'attention de ce travail de recherche se porte à présent sur la toxicité de molécules organiques (en plus faibles quantités mesurées dans les RITS), seules et en mélanges avec des métaux.

3 “ECOTOXICORESPONSABLE”

L’objectif final des industriels du TS est de consommer moins de matières premières (métaux, solvants...), et par voie de conséquence de polluer moins. Le principal problème réside dans la complexité et la variabilité de leurs rejets. Si les métaux restent encore “simples” à manipuler, les molécules organiques telles que les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques HAPs, les Composés Organiques Volatiles COVs *etc* ne le sont pas du tout. La complexité de leurs structures, leurs propriétés physiques et chimiques les rendent difficiles à tester chimiquement (*e.g.* abattement chimique) et écotoxicologiquement (*e.g.* tests de germination). C’est la raison pour laquelle, cette étude écotoxicologique est restreinte à quelques polluants organiques (Tergitol, 4-nonylphénol, naphthalène et phtalate dibutyle). Le naphthalène a été plus étudié puisqu’il a été testé seul et en mélange avec 3 métaux (Cu, Ni, Zn). Les résultats sont présentés dans le chapitre 3.1.

Nous avons également étudié *bibliographiquement* le cas particulier des alkylphénols APs et de leurs dérivés, les alkylphénols polyéthoxylés APEOs (chapitre 3.2). Ces molécules organiques, lipophiles sont ubiquitaires et très persistantes dans l’environnement (Becue & Nguyen, 2005 ; Bergé, 2012). En effet, les APs sont des surfactants très largement utilisés dans la fabrication de détergents, de résines, de pesticides, et d’une très large gamme de produits industriels ; des agents émulsifiants particulièrement utilisés dans la fabrication de produits cosmétiques (shampooings, crèmes et nettoyants pour la peau, produits capillaires...) ; ils sont également les produits de dégradation des APEOs. Parmi les APs, les nonylphénols NPs sont reconnus comme les principales molécules produites et commercialisées dans le monde. Elles appartiennent à la liste des substances ciblées par la campagne RSDE (Circulaire, 2002 ; [Tableau I.3](#)), et sont également reconnues par l’Union Européenne comme **perturbateurs endocriniens** pour l’Homme et la faune (Purdom *et al.*, 1994 ; Lund, 2000 ; Regulation EC, 2006 ; Balacanič *et al.*, 2011 ; Ma *et al.*, 2011 ; Résolution EC, 2013). Malgré l’augmentation des recherches en ce sens, le traitement de ces produits, synthétiques *in extenso*, reste difficile et rarement approprié. L’article présenté dans le chapitre 3.3 liste les différents modes d’élimination physico-chimiques des APs contenus dans les eaux, les eaux de rejets et les rejets industriels.

3.1 Métaux & Molécules organiques

Des analyses chimiques plus exhaustives de RITS confirment la présence en quantités *mesurables* de HAP (Tableau III.9).

Tableau III.9. Analyse physico-chimique d'un rejet issu du traitement de surface (Zindel, 16 octobre 2013). L'analyse des HAP s'est focalisée sur les seize molécules organiques ciblées par US EPA, 1976 ; Figure V.3.

Paramètre	Valeur	Paramètre	Valeur
pH	8,3	IH ³	< LQ
DCO ¹	406	Azote Kjeldahl	41,7
MES ²	25	Azote Global	186,8
Elément	Concentration [mg L ⁻¹]	Elément	Concentration [ng L ⁻¹]
Chrome	0,14	Naphtalène	97,17
Chrome VI	< LQ	Acénaphthylène	6,38
Cuivre	< LQ	Acénaphène	63,69
Cyanures ⁴	< LQ	Fluorène	134,13
Fer	1	Phénanthrène	362,31
Nickel	0,42	Antracène	16,57
Zinc	1,5	Fluoranthène	48,22
Nitrates	576	Pyrène	29,15
Nitrites	49,2	Benzo(a)anthracène	1,04
Phosphore total	0,13	Chrysène	2,25
Chlore libre	0,176	Benzo(b)fluoranthène	0,86
		Benzo(k)fluoranthène	0,85
		Benzo(a)pyrène	0,81
		Indeno(1,2,3-cd)pyrène	0,82
		Dibenzo(a,h)anthracène	0,66
		Benzo(g,h,i)pérylène	0,73

¹ NF T 90-101

² Filtre Millipore AP40

³ Indice Hydrocarbures en mg L⁻¹

⁴ Oxydables au chlore

Les HAPs sont des composés (organiques) apolaires, organisés en au moins deux cycles benzéniques aromatiques. La principale source de HAPs dans l'atmosphère et dans l'environnement générale est la pyrolyse-pyrosynthèse de la matière organique et d'imbrûlés. Ils peuvent être naturels (*e.g.* feux de forêt, éruptions volcaniques...) ou anthropiques (*e.g.* combustion automobile, activités industrielles, feux domestiques...). Leur ubiquité ainsi que la difficulté de traiter les milieux contaminés les caractérisent comme des polluants organiques persistants POPs (UNECE, 1998). Une grande part de

ces éléments (HAPs) est insoluble dans l'eau. Il est alors très difficile de tester leur écotoxicité sur des semences de laitues (Figure III. 4).



Figure III.4. Illustration de la tentative de test de l'alcool C12-15 éthoxylé (n°CAS : 68131-39-5.)

Les caractéristiques physico-chimiques des quatre polluants organiques étudiés sont listées dans le tableau suivant.

Tableau III.10. Propriétés physico-chimiques du tergitol (NP9), du 4-nonylphénol (4NP), du naphthalène (NAP) et du phtalate de dibutyle (DBP).

Propriété	Tergitol NP-9	4-nonylphénol	Naphtalène	Phthalate de dibutyle
N°CAS	127087-87-0	84852-15-3	91-20-3	84-74-2
Formule brute	$C_{33}H_{59}O_{10}$	$C_{15}H_{24}O$	$C_{10}H_8$	$C_{16}H_{22}O_4$
Poids moléculaire [g mol ⁻¹]	616,8	220,3	128,2	278,34
Point de fusion [°C]	3,8	81-83	80,2	-35
Point d'ébullition [°C]	295-320	295-320	217,96	340
Couleur (état)	Jaune pâle (liquide)	Incolore à jaune paille (liquide)	Incolore (cristaux)	Incolore (liquide)
Densité	1,055	0,953	1,162	1,047
Pression de vapeur [Pa]	1.10^{-10}	$4,55 \pm 3,5.10^{-3}$	11	$1,3.10^{-3}$
Solubilité [mg L ⁻¹]		5,43	32	10
Log Kow	3,59	4,2-4,48	3,3	4,57
Constante de Henry [Pa m ³ mol ⁻¹]	-	11,02	48,9	-

3.1.1 Matériel et Méthodes

3.1.1.1 Tests de germination

Les tests de germination ont à nouveau été réalisés sur des semences de Batavia dorée de printemps, sans adaptation particulière.

3.1.1.2 Solutions testées

Toutes les solutions ont été réalisées à partir de réactifs de laboratoire certifiés¹, dissouts dans de l'eau osmosée. Les protocoles expérimentaux d'évaluation de l'écotoxicité sont présentés dans les [Tableaux III.11 et III.12](#).

Tableau III.11. Gammes de concentrations des 4 polluants organiques testés.

Elément	Concentration [mg L ⁻¹]
NP9 ¹	0-1-5-10-25-50-75-100
4NP	0-10-20-40-60-80-100
NAP	0-0,5-1-5-10-25-50
DBP ²	0-5-10-25-50-75 %

¹ en mL L⁻¹

² en % de DBP pur (produit trop "huileux")

Tableau III.12. Gammes de concentrations lors des tests de germination de *L. sativa* var Batavia dorée de printemps.

Elément		Concentration [mg L ⁻¹]										
	code ¹	T	A	B	C	D	E	F				
Test #1	NAP	0	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5				
	NiSO ₄	0	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5				
Test #2	code ¹	T	A	B	C	D	A'	B'	C'	D'		
	NAP	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5		
	NiSO ₄	0	1,5	0	1,5	1,5	1,5	0	1,5	1,5		
	CuSO ₄	0	1,5	1,5	0	1,5	1,5	1,5	0	1,5		
	ZnSO ₄	0	2	2	2	0	2	2	2	0		
Test #3	code ¹	T	A	B	C	D	E	A'	B'	C'	D'	E'
	4NP	0	50	50	50	50	50	100	100	100	100	100
	NiSO ₄	0	0,5	1	1,5	70	100	0,5	1	1,5	70	100

¹ un code est attribué à chaque condition afin de simplifier la lecture des résultats

¹ En poudre ou liquide

3.1.2 Résultats & Discussion

Les résultats des tests de germination présentés dans le [Tableau III.13](#), permettent de classer les quatre molécules organiques testées de la plus à la moins toxique : NP9 (ou tergitol), DBP, NAP et 4NP.

Tableau III.13. CE₅₀ du NP9, du 4NP, du NAT et du DBP.

Elément	CE ₅₀ [mg L ⁻¹]
NP9	63,30 ¹
4NP	99,10
NAP	78,25
DBP	66,55

¹mL L⁻¹

Nous avons procédé à des tests de germination des deux substances les plus toxiques NAP et 4NP, en mélange, simple ou multiple, avec des ETMs. Les résultats de ces tests sont présentés dans les [Tableaux III.14, III.15 et III.16](#).

A relativement faibles concentrations (0,1 et 0,5 mg L⁻¹), le naphthalène ne semble pas avoir d'effet supplémentaire significatif à l'effet du nickel seul ([Tableau III.14](#)), ou en mélange avec le cuivre et le zinc¹ (p = 0,07 ; [Tableau III.15](#)).

Tableau III.14. Résultats test #1.

Condition	GR [%]	Condition	GR [%]	<i>p value</i>
A	83 ± 4,7	D	81 ± 1,6	0,84
B	91 ± 5,7	E	91 ± 5,76	1
C	83	F	80 ± 2,7	0,7

Témoins : GR=97 %

L'étude des interactions entre substances en mélanges, dans un contexte de co-exposition, est très complexe, principalement à cause de la variabilité multifactorielle (Charles, 2012). De nombreux modèles d'interactions ont été pensés, réfléchis et démontrés. Dans le cas du naphthalène, il semble, qu'à faibles concentrations, sa présence ne perturbe pas, positivement ou négativement, l'action seule du nickel ainsi que celle conjointe du nickel-cuivre-zinc.

¹ Les concentrations de nickel (sauf 70 et 100 mg L⁻¹), cuivre, et zinc lors de ces tests sont des concentrations réalistes, représentatives de concentrations mesurables dans des RITS.

Tableau III.15. Résultats test #2.

Condition	GR [%]	Condition	GR [%]	<i>p value</i>
A	76 ± 8,3	A'	79 ± 4,2	0.72
B	81 ± 3,1	B'	74 ± 1,6	0.37
C	81 ± 5,7	C'	80 ± 2,7	1
D	83 ± 4,7	D'	77 ± 4,7	0.35

Témoins : GR = 93 ± 2,7 %

Le 4NP n'a pas été testé en mélange avec le nickel à faibles concentrations (50 et 100 mg L⁻¹). Il semble néanmoins que le mélange A du test 3 ne soit pas différent des témoins (Tableau III.16 ; $p = 0.60$). Excepté pour les bioessais B et B' du test 3 ($p = 0,10$), les taux de germination des conditions A', C', D', E' sont statistiquement inférieures aux conditions A, C, D, E. On peut en déduire un effet du 4NP, sans pour autant oublier que les concentrations testées sont extrêmement fortes.

Tableau III.16. Résultats test #3.

Condition	GR [%]	Condition	GR [%]	<i>p value</i>
A	93 ± 7,2	A'	76 ± 1,6	< 0,01
B	83 ± 12	B'	72 ± 6,3	0,10
C	98 ± 1,6	C'	74 ± 1,6	< 0,001
D	0	D'	16 ± 6,8	< 0,001
E	0	E'	8 ± 11	< 0,05

Témoins : GR = 97 ± 2,4 %

La diminution des valeurs de GR au sein d'une même concentration a permis de calculer deux CE₅₀, exprimées en fonction de la concentration en NiSO₄ (Figure III.5) : égale à 14,38 mg L⁻¹ pour la gamme de nickel additionné de 50 mg L⁻¹ de 4NP, égale à 5,44 mg L⁻¹ pour la gamme de nickel additionné de 100 mg L⁻¹ de 4NP. L'adjonction de 4NP a un effet sur la toxicité du sulfate de nickel seul (CE₅₀ = 58,3 ± 14 mg L⁻¹). Dans ces conditions (les deux composants du mélange ont un effet individuel), on peut envisager deux type d'effets (Badot *et al.*, 2011 ; Charles, 2012) :

- synergique : effet supra-additif, où l'effet combiné des composants est supérieur à l'effet additif prédit par les modèles, *i.e.* la somme des effets. Les composants interagissent ;
- additif strict : l'effet observé du mélange correspond à la toxicité attendue. Les composants du mélange n'interagissent pas, leurs effets s'additionnent seulement.

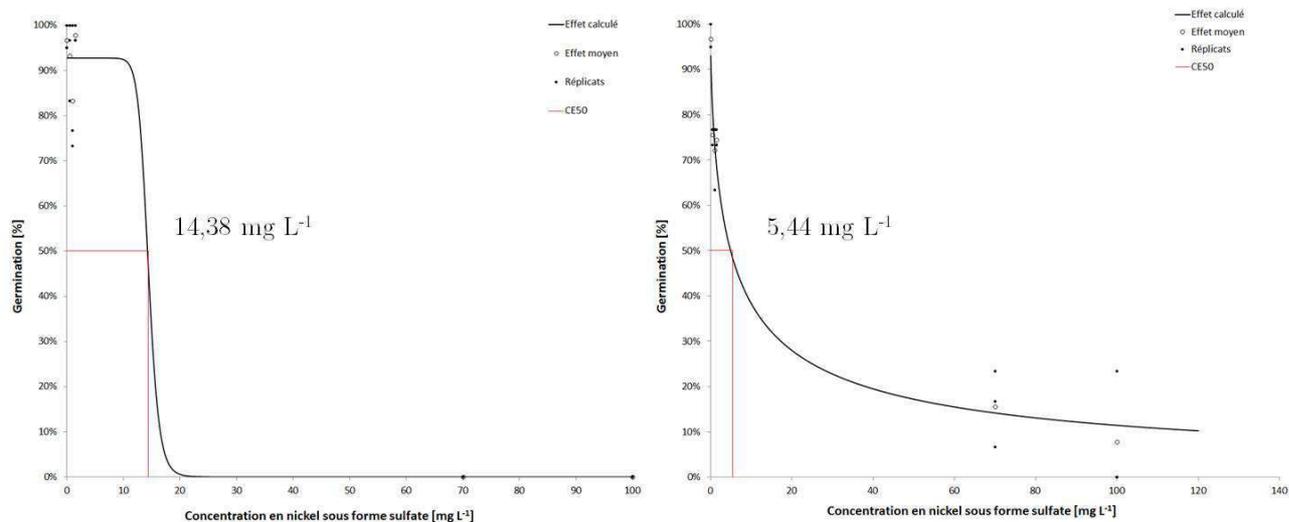


Figure III.5. Courbes dose-réponse des gammes de mélange de 4NP et de sulfate de nickel, exprimées en fonction de la concentration de nickel dans la solution (gauche : 50 mg L^{-1} de 4NP ; droite : 100 mg L^{-1} de 4NP).

3.1.3 Conclusions & Perspectives

Les études d'évaluation de l'écotoxicité de substances polluantes en mélange sont de plus en plus fréquentes, qu'il s'agisse de solutions synthétiques ou de substances cibles au sein d'un rejet ou d'un environnement pollué. Elles sont néanmoins souvent cantonnées à quelques éléments d'un seul type de polluants (*e.g.* quelques ETMs, quelques POPs... ; *e.g.* Berryman *et al.*, 2004 ; Bi *et al.*, 2006 ; Gao *et al.*, 2006 ; Eom *et al.*, 2007 ; Benzarti *et al.*, 2008 ; Di Salvatore *et al.*, 2008 ; Lefevre *et al.*, 2009 ; Crosse *et al.*, 2012). Rares sont les études qui envisagent de possibles interactions *in situ*, et leurs effets, entre polluants métalliques et organiques par exemple (*e.g.* Khan *et al.*, 2008 ; Goutte *et al.*, 2014).

L'avantage s'il en est, des recherches *in vitro* et/ou *ex situ*, est qu'elles sont *a priori* (*cf.* Tableau III.3 ; Figure III.4) plus facilement réalisables. Elles permettent la génération de bases de données importantes dans l'explication (sans pour autant tomber dans une extrapolation excessive) de phénomènes d'additivité, de synergie, d'antagonisme... des polluants en présence *in situ*. L'importance de ces tests écotoxicologiques sur les interactions possibles entre des polluants organiques et métalliques présents dans les RITS paraît donc évidente.

3.2 Article in press par Arab J Chem¹

“Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination”.

Authors : Anne Priac, Nadia Morin-Crini, Coline Druart, Sophie Gavaille, Corina Bradu, Céline Lagarrigue, Giangiacomo Torri, Peter Winterton, Grégorio Crini.

Abstract :

During the last 10 years, the appearance of emerging organic compounds described as endocrine disrupters in wastewaters and water resources has become a major concern for both society and public health authorities, the whole industrial world and the agricultural sector. Endocrine disrupting compounds are found in the various environmental compartments such as water, sediments, soils and atmosphere, as a result of their wide use. Numerous products are concerned including surfactants, industrial additives and formulations, pharmaceuticals, and also personal care products. However, the existing conventional water treatment plants were not designed for these new contaminants. In the present study, an overview of the literature on methods for elimination (removal and/or degradation) of emerging trace organic contaminants is presented. This review is limited to details of the treatment of one class of endocrine disrupters, namely alkylphenols and their polyethoxylate derivatives, which are suspected to interfere with the hormonal system of wildlife. The technologies proposed for alkylphenol treatment include membrane treatment using biological (membrane bioreactors) or physical processes (membrane filtration such as nanofiltration), biotechnological-based methods (biofilms, immobilized enzymes, *etc.*), adsorption-oriented processes using conventional (activated carbons) or nonconventional adsorbents (clays, cyclodextrin, *etc.*), and advanced oxidation processes (photocatalysis, photolysis, sonochemistry). Examples are taken from the literature to illustrate the various features of the technologies used in decontamination methods. Among them, photocatalytic oxidation is an interesting tool for alkylphenol treatment due to its potential to reach complete mineralization.

DOI : 10.1016/j.arabjc.2014.05.011

¹ Arabian Journal of Chemistry <http://www.journals.elsevier.com/arabian-journal-of-chemistry/>
DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.05.011

3.2.1 Introduction

From the environmental point of view, the organic molecules that are of greatest current concern are those which, either by their presence or their accumulation, can have a toxic or an inhibitory effect on living organisms. Among these molecules, endocrine disrupting compounds (EDCs) have been investigated due to their adverse effects in animals and humans inhibiting the normal action of the endocrine system. The list of these xenobiotic compounds is extensive and includes for example the following families of chemicals: alkylphenols, phthalates, bisphenol A, polybromodiphenylethers, and natural and synthetic estrogens (Crini and Badot, 2007). Among these, alkylphenols (APs), and in particular their polyethoxylated derivatives (alkylphenol ethoxylates, APEOs), deserve particular attention. By far the most commercially important AP is nonylphenol (NP) which is used primarily to produce nonylphenol ethoxylate (NPEOs) surfactants for a wide variety of applications and consumer products: paints and latex paints, adhesives, inks, washing agents, formulation of pesticides (emulsions), paper industry, textile and leather industry, petroleum recovery chemicals, metal working fluids, personal care products, cleaners and detergents, *etc.* Also commercially significant are octylphenol (OP) and octylphenol ethoxylates (OPEOs). NPEOs represent around 80% of APEOs while OPEOs make up most of the remaining 20%.

As a consequence of the use, discharge and biodegradation of NPEOs, NP occurs ubiquitously in the environment. For instance, NPEOs and also OPEOs are unstable in the environment and both undergo the same processes of degradation to yield metabolites that are generally more

stable and thus more persistent. From the ecotoxicological point of view, NP is persistent in the aquatic environment, moderately bioaccumulative, and extremely toxic to aquatic organisms (Soto *et al.*, 1991; Comber *et al.*, 1993; Baldwin *et al.*, 1997; Severin *et al.*, 2003; Brian *et al.*, 2005; Ishibashi *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008; David *et al.*, 2009; Lozano *et al.*, 2012). Though less toxic than NP, NPEOs are also highly toxic to aquatic organisms, and in the environment degrade to more environmentally persistent NP (Naylor *et al.*, 1992; Ahel *et al.*, 1993; Talmage, 1994; Argese *et al.*, 1994; Servos, 1999; Maguire, 1999; Lozano *et al.*, 2012). In addition, these emerging compounds exert endocrine disruption effects since they mimic natural hormones by interacting with estrogen receptors. Not all isomers are equally effective: the para-position of the phenolic OH-group and branched aliphatic side-chain appear to be determinant. Kim *et al.* (2004), Preuss *et al.* (2006), and Bärlocher *et al.* (2011) reported that the branched NPs exhibit a higher endocrine activity than linear NP. It is important to note that not only the parent molecules but also their degradation products represent a potential ecotoxicological problem in aquatic systems (Soares *et al.*, 2008; Rizzo, 2011) due to their widespread occurrence in surface waters and persistence in sediments. The particular case of NPs provides a good illustration of the way in which relatively inoffensive anthropogenic substances can be transformed into toxic compounds in the environment. NPEOs in domestic wastewater reach the sewage treatment plant where microorganisms progressively decompose the ethoxy chain to finally release several compounds including the NP that was initially used to synthesize the detergents (Crini and Badot, 2007).

Actually, from the analytical point of view, the methodologies for monitoring APs and APEOs are now well known and, in general, gas chromatography coupled with mass spectrometric detection is the most commonly applied analytical technique due to its simplicity, robustness, and reproducibility (Ahel and Giger, 1985; Lee, 1999; Richardson, 2002; Loos *et al.*, 2008; Asimakopoulos *et al.*, 2012; Selvaraj *et al.*, 2014). Information on the applicable sample preparation techniques, the instrumental analysis and the monitoring of NP and OP can be found in the recent review of Asimakopoulos *et al.* (2012). Humans are mainly exposed to APs by the intake of contaminated foods and drinking water. NP and OP present in plastic containers and wrappings may migrate into foods and drinking water. Other routes of human exposure include contact with personal care products and detergents, and the use of spermicides in contraceptives (Talmage, 1994). NP has been detected in human milk, blood, and urine.

In Europe (Directive 2003/53/EC, 2003), the use of EDCs, and in particular APEs, is today restricted. The main alternatives for NPEOs include linear and branched alcohol ethoxylates, and glucose-based carbohydrates such as alkylpolyglucoside. Despite this, they are still likely to appear in many European wastewater streams, as in the case in France, a result of their frequent industrial use. In this context, it is necessary to propose and develop various efficient technologies for the elimination of APs from water and wastewater.

Several reviews dealing with different aspects of relevance for the treatment of EDCs should be mentioned. Gültekin and Ince (2007), and Belgiorino *et al.* (2007) discussed the treatability of EDCs in water

by advanced oxidation processes. EDC removal using physical means, biodegradation, and chemical decomposition by advanced oxidation was also reviewed by Liu *et al.* (2009), and Bolong *et al.* (2009). Cabana *et al.* (2007a) extensively reviewed the ability of white rot fungi (WRF) and their lignin modifying enzymes, *i.e.* laccase, to treat EDCs from solutions. Murray and Öermeci (2012) presented recent research results on molecularly imprinted and non-imprinted polymers and evaluated their potential as a method of treatment for the removal of emerging contaminants from water and wastewater. Basile *et al.* (2011) critically discussed the basic principles of the advanced technologies used for EDC control in water and wastewater. Few reviews have focused on AP removal (Soares *et al.*, 2008). The present review is limited to the methods for the removal and/or the degradation of one class of endocrine disruptors, namely alkylphenols. Among the methods reported, adsorption-oriented processes, membrane-oriented treatment, biotechnological methods and advanced oxidation processes are the most frequently considered as they may be appropriate for removing trace concentrations of APs.

3.2.2 Overview of APs as emerging pollutants

Since the end of the 2000s, numerous reviews and articles have reported the presence of novel chemical compounds, called emerging pollutants, not only in water, wastewater and aquatic environments, but also in sediments, soils and the atmosphere (Crini and Badot, 2007). Recent information on the so-called emerging pollutants in wastewater can be found in a review published by Deblonde *et al.* (2011). The definition of ‘emerging’ is, however, not clear (Field *et al.*, 2006;

Stasinakis, 2012). The US Environmental Protection Agency defines emerging pollutants as new chemicals without regulatory status and with an impact on the environment and human health that is poorly understood. These include polycyclic aromatic hydrocarbons PAHs (anthracene, phenanthrene), volatile organic compounds VOCs (chloroform, trichloroethylene) and endocrine disruptors such as APs, phthalates, bisphenol A, and natural and synthetic estrogens. Some trace pollutants (*e.g.* VOCs, HAPs) have an already recognized environmental impact while others (*e.g.* endocrine disruptors) are currently a subject of concern and debate (Crini and Badot, 2007). Among the emerging pollutants, numerous studies concern APs and APEOs mainly because they are suspected to interfere with the hormonal systems of wildlife. APEOs are also unstable in the environment and their degradation yields metabolites that are often more stable and thus more persistent, and that can also be more toxic. In general, the presence of APs results from the degradation of APEOs. The fate, presence, toxicity, behavior and degradation of APs in the atmosphere, sewage sludge, water, sediments and soils have been reported in numerous reviews (Table III.17), and in particular in the overviews of Ying (2006), Corvini *et al.* (2006), Soares *et al.* (2008), and David *et al.* (2009).

APs and APEOs are synthetic molecules that, in spite of their high cost, are used in numerous industrial, agricultural, and household applications. This is due to their different and important roles: they can act for instance as detergents, emulsifiers, wetting agents, dispersants, or solubilizers. From a

structural chemistry point of view, these molecules include numerous isomers. In general, the term of alkylphenols (abbreviated to APs in the literature) is used to refer to two groups of compounds: nonylphenols (NPs) and octylphenols (Ops). Among the nonylphenols (Figure III.5), the nine-carbon nonyl group may be linear or branched and bind at various locations around the phenol ring (ortho, meta and para), and this can be a source of confusion concerning the precise identity of the substance (Reed, 1978). NP is not a single chemical structure: it is a mixture of highly branched NPs, largely mono-substituted in the para-position, with small amounts of ortho- and di-substituted NPs. Also it includes branched C8 and C10 alkyl groups (Reed, 1978; Seidel, 2004). Other structures such as propyl-, butyl-, pentyl-, hexyl-, octyl-phenols are also possible. Theoretically, NP consists of a mixture of 211 possible constitutional isomers with a highly branched alkyl chain and 50-80 isomers that can exist in appropriate environmental matrices (Guenther *et al.*, 2006).

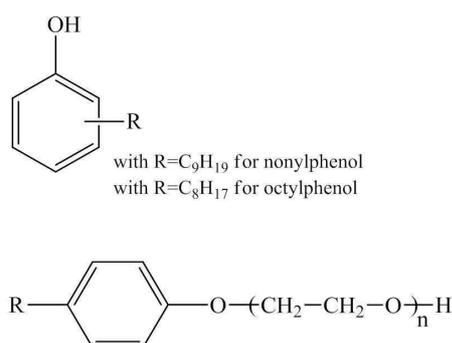


Figure III.6. General molecular structure for alkylphenols abbreviated APs (left) and alkylphenol ethoxylates abbreviated APEOs (right) where n is the average number of moles of ethylene oxide per mole of nonylphenol and ranges from 1 to 100.

Table III.17. Literature reviews on alkylphenol substances (selected papers).

Topic	Substance	Source
Aquatic toxicity	APs, APEOs, APnEOs	Hager, 1998 ; Servos, 1999 ; Sharma <i>et al.</i> , 2009
Analysis	APs	Bergé <i>et al.</i> , 2012 ; Basile <i>et al.</i> , 2011
Behavior	EDCs	Langford and Lester, 2002
Bioaccumulation	APs, APnEOs	Servos, 1999
Biodegradation	APs, NP, EDCs	Hager, 1998 ; Corvini <i>et al.</i> , 2006 ; Liu <i>et al.</i> , 2009
Coastal and marine ecosystems	APs	David <i>et al.</i> , 2009
Emerging contaminants	APs, EDCs	Langford and Lester, 2002 ; Bolong <i>et al.</i> , 2009 ; Deblonde <i>et al.</i> , 2011 ; Clarke and Smith, 2011 ; Gonzalez <i>et al.</i> , 2012 ; Stasinakis, 2012
Environmental activity	APEOs	Hager, 1998
Environmental fate	APs, APEOs, NP	Ying <i>et al.</i> , 2002 ; Soares <i>et al.</i> , 2008 ; Sharma <i>et al.</i> , 2009
Environmental safety	APs, APEOs	Talmage, 1994 ; Vasquez-Duhalt <i>et al.</i> , 2005
Estrogenic effects	APEOs	Nimrod and Benson, 1996 ; Servos, 1999
Human safety	APs, APEOs	Talmage, 1994
Microbial degradation	NP, AP	Corvini <i>et al.</i> , 2006
Monitoring	APs, APEOs, NPs, NPEOs	Ahel and Giger, 1985 ; Lee, 1999 ; Petrovic <i>et al.</i> , 2003 ; David <i>et al.</i> , 2009 Vincent and Sneddon, 2009 ; Asimakopoulos <i>et al.</i> , 2012 ; Bergé <i>et al.</i> , 2012
Occurrence	APs, APEOs, NP	Ahel <i>et al.</i> , 1994 ; Bennie, 1999 ; Soares <i>et al.</i> , 2008 ; Sharma <i>et al.</i> , 2009
Persistence	APs, APEOs	Maguire, 1999 ; Vasquez-Duhalt <i>et al.</i> , 2005
Solubility	APs, APnEOs	Ahel and Gigger, 1993
Toxicity	NP	Soares <i>et al.</i> , 2008
Treatment	APs, EDCs	Johnson and Sumpter, 2001 ; Langford and Lester, 2002 ; Petrovic <i>et al.</i> , 2003 Snyder <i>et al.</i> , 2006 ; Belgiorno <i>et al.</i> , 2007 ; Cabana <i>et al.</i> , 2007a ; Crini and Badot, 2007 ; Liu <i>et al.</i> , 2009 ; Sharma <i>et al.</i> , 2009 ; Bolong <i>et al.</i> , 2009 ; Gültekin and Ince, 2007 ; Murray and Örmeci, 2012

Much of the literature refers to linear or normal NPs, often the specific para regioisomer (i.e. 4-n-nonylphenol). This is more problematic for APEO substances which are composed of a branched AP coupled to a polyether chain consisting of ethylene oxide units. They are manufactured by reacting branched olefins with phenol in the presence of an acid catalyst under basic conditions. NPnEO is depicted in [Figure III.5](#) where n is the average number of moles of ethylene oxide per mole of nonylphenol, ranging from 1 to 100. The degree of ethoxylation depends on the molar ratio of NP to olefin (ethylene oxide in this case). The NPEO most commonly used in cleaning agents uses n=9 (NP9EO). In addition, for NPEO surfactants, there are also several other nomenclatures such as nonoxynol, nonylphenol polyglycol ether, nonylphenoxy[poly(ethyleneoxy)] ethanol or α -(nonylphenyl)- ω -hydroxy-poly(oxyethylene). In all cases, it is important to use the information given by the manufacturers and the Chemical Abstract Service (CAS registry names and numbers) for a complete and clear identification of the APEs and APEOs substances used. CAS number 84852-15-3 corresponds to the most widely produced nonylphenol, branched 4-nonylphenol, and referred to in the literature as NP. [Table III.18](#) and [Figure III.6](#) show the CAS numbers for several NPs, OPs, NPEOs and OPEOs and their molecular structures.

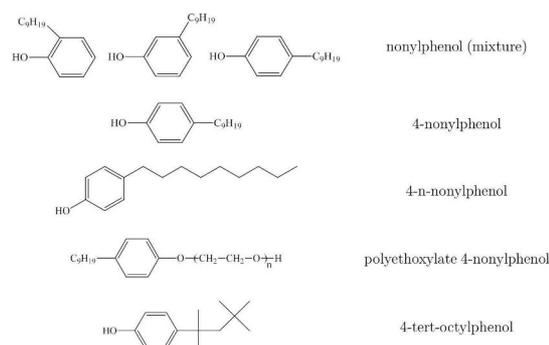


Figure III.7. : Molecular structures of some APs.

NP is considered as a hydrophobic molecule with a high $\log K_{ow}$ (i.e., approximately 4.5), thus making it poorly soluble. As such, it preferentially associates with suspended solids. Water solubility is directly proportional to n (Ahel and Giger, 1993; Ying *et al.*, 2002). Its value is the number of polar groups forming the hydrophilic part of the molecule. Lower oligomers (<5) are described as water-insoluble or lipophilic whereas the higher oligomers are water-soluble or hydrophilic. The solubilities of OP1EO and OP2OE were significantly greater than those of NP1EO, NP2EO and NP ([Table III.19](#)), indicating the predominant influence of the hydrophobic chain length on APnEO solubility. The $\log K_{ow}$ values for APEO metabolites suggested that these substances may become associated with organic matter in sediments ([Table III.19](#)).

Table III.18. Chemical Abstracts Service (CAS) registry names, numbers and abbreviation for several APs.

CAS Number	CA Index name / Other names	Abbreviation(s)	Structure	Substance	Formula
25154-52-3	nonylphenol nonylphenols n-nonylphenol monononyphenol	n-NP NP NPs	C ₉ H ₁₉ : linear	mixture	C ₁₅ H ₂₄ O
84852-15-3	4-nonylphenol branched 4-nonylphenol para-nonylphenol p-nonylphenols	4-NP p-NP NP	C ₉ H ₁₉ : linear and/or branched	mixture	C ₁₅ H ₂₄ O
104-40-5	4-n-nonylphenol linear para-nonylphenol n-para-nonylphenol	4-n-NP n-4-NP p-NP	C ₉ H ₁₉ : linear	one isomer	C ₁₅ H ₂₄ O
26027-38-3	polyethoxylate 4-nonylphenol nonylphenol ethoxylates poly(oxy-1,2-ethanediyl), α -(4-nonylphenyl)- ω -hydroxynonylphenol	4-NPnEOs 4-NPnEO NPnEOs	C ₉ H ₁₉ : linear	mixture	(C ₂ H ₄ O) _n C ₁₅ H ₂₄ O
28679-36-3	nonylphenol monethoxylate	NP1EO	C ₉ H ₁₉ : linear	mixture	C ₁₇ H ₂₈ O ₂
27176-93-8	nonylphenol diethoxylate	NP2EO	C ₉ H ₁₉ : linear	mixture	C ₁₉ H ₃₂ O ₃
104-35-8	4-nonylphenol monethoxylate	n-4-NP1EO	C ₉ H ₁₉ : linear		C ₁₇ H ₂₈ O ₂
20427-84-3	4-n-nonylphenol diethoxylate	n-4-NP2EO	C ₉ H ₁₉ : linear		C ₁₉ H ₃₂ O ₃
140-66-9	4-octylphenol para-octylphenol octylphenol 4-tert-octylphenol 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol	t-4-OP 4-OP OP	branched	one isomer	C ₁₄ H ₂₂ O
1806-26-4	4-n-octylphenol n-para-octylphenol octylphenols	n-4-OP	C ₈ H ₁₇ : linear	one isomer	C ₁₄ H ₂₂ O
2315-67-5	octylphenol monethoxylate	t-4-OP1EO	branched		C ₁₆ H ₂₆ O ₂
2315-61-9	octylphenol diethoxylate	t-4-OP2EO	branched		C ₁₈ H ₃₀ O ₂

Table III.19. Properties of some NPs and OPs (Source: Ying *et al.*, 2002).

CAS Number	Abbreviation	Molecular weight	Water solubility ^a	logK _{ow} ^b	Organic carbon sorption constant ^c	Half-life in river water ^d
25154-52-3	NP	220	5.43	4.48	245.470	30; 35-58
28679-36-3	NP1EO	264	3.02	4.17	288.403	
27176-93-8	NP2EO	308	3.38	4.21	151.356	
140-66-9	OP	206	12.6	4.12	151.356	8.1-51
2315-67-5	OP1EO	250	8.0	4.10		
2315-61-9	OP2EO	294	13.2	4.00		

^a in mg L⁻¹ at 20°C

^c in L kg⁻¹

^b logarithmic values of octanol/water partition coefficient

^d in days

3.2.3 Alkylphenols in water, wastewater and industrial discharge water

The presence of APs has been detected in all aquatic environments *i.e.* freshwater, coastal and marine ecosystems. NP is found in oceans, estuaries, coastal lagoons, lakes, rivers, surface waters, groundwater, and other sources of potable water. Numerous studies are in agreement that NP occurrence in aquatic environments is mainly correlated with the discharge of effluents from sewage treatment plants, with a higher incidence in those works treating wastewaters from industrialized/urban areas and with other related anthropogenic activities such as storm water discharges and run-off (Naylor *et al.*, 1992; Ahel *et al.*, 1994a; Corsi *et al.*, 2003; Hale *et al.*, 2000; Langford and Lester, 2002; Soares *et al.*, 2008).

The European Union has included APs and their derivatives in the list of priority hazardous substances for surface waters in the Water Framework Directive (Directive 2000/60/EC, 2000) for which a drastic reduction policy is being implemented (Directive 2003/53/EC, 2003). Environmental quality standards (EQS)

have been proposed for priority substances to provide a benchmark for achieving the good surface water chemical status that EU member states are required to respect. The EQS, which indicate the annual average concentration, for NP and OP in water surface were proposed at 0.3 µg L⁻¹ and 0.1 µg L⁻¹, respectively (David *et al.*, 2009). The NP concentration was close to the 90th percentile found (0.268 µg L⁻¹) by Loos *et al.* (2009) in 122 water samples from several European rivers. In this study, the authors reported that only about 10% of the river water samples analyzed could be classified as very clean in terms of chemical pollution. In a previous work, Loos *et al.* (2008), working on a laboratory and sampling intercomparison study for the chemical monitoring of emerging pollutants including NP and OP, reported that some laboratories have problems in analyzing NP at concentrations below 100 ng L⁻¹ due to contamination of laboratory blanks. They concluded that plastic materials should not be used during extraction or sample preparation. For instance, it is difficult to compare AP concentrations reported in the different studies because of the differences in sample monitoring (extraction strategies and analytical methods used) for quantification (Crini and Badot, 2007). The

reader is encouraged to refer to the original articles for information on experimental conditions.

Other Environmental Protection Agencies have also adopted directives for these xenobiotic compounds listed as priority pollutants. The US EPA developed chronic criterion recommendations for NP, whereby its concentration should not exceed $6.6 \mu\text{g L}^{-1}$ in freshwater and $1.7 \mu\text{g L}^{-1}$ in saltwater (Brooke and Thursby, 2005). The French Water Agency has included 4-n-NP and 4-OP in the list of high priority hazardous substances which must no longer be allowed to pollute and in the list of priority hazardous substances whose levels in pollution must be reduced, respectively.

A wide range of endocrine disrupters including AP have been found in sewage and output of municipal wastewater treatment plants (Gallenkemper *et al.*, 2003; Crini and Badot, 2007). The presence of NP in wastewater treatment plants was first documented by Giger *et al.* (1984). The authors reported that primary degradation of APEOs in wastewater treatment plants or in the environment generates more persistent shorter-chain APEs and Aps. Ying *et al.* (2002), and David *et al.* (2009) also reported that APEOs are biodegraded during the processes taking place in sewage treatment plants and partially in the environment by loss of ethoxy groups, resulting in more toxic subunits such as NPs and OP and other mono-, di- and tri-ethoxylates. NP typically occurs in the $\mu\text{g L}^{-1}$ range in effluents (Porter and Hayden, 2003; Bärlocher *et al.*, 2011), but concentrations of up to $343 \mu\text{g L}^{-1}$ have been reported by Ying *et al.* (2002).

In rivers, lakes and streams, NP concentrations can range from below detection levels to highs of $>600 \mu\text{g L}^{-1}$ (Sole *et al.*, 2000; Shao *et al.*, 2005;

Vasquez-Duhalt *et al.*, 2005). For example, Sole *et al.* (2000) measured NP values of up to $644 \mu\text{g L}^{-1}$ in a Spanish river in the vicinity of urban discharges and sewage treatment plants. NP concentrations have been reported between 0.7 and 15 ng L^{-1} in river water, also near sewage treatment plants, by Bester *et al.* (2001) and Petrovic *et al.* (2002). The results presented seasonal variations with higher concentrations in the summer due to an increase in microbial activity with warmer temperatures leading to an enhanced degradation of NPEOs. Li *et al.* (2004) also reported NP concentrations in a Korean river ranging from 6.8 to 190.8 ng L^{-1} with concentrations higher in the warmer season than in the colder season. Other factors such as river flow and sedimentation influence the rate of degradation (Li *et al.*, 2004). Water samples and corresponding drinking water samples were collected seasonally at five sites of each of the two main rivers in the Chongqing Area, China by Shao *et al.* (2005). NPEOs and 4-NP in the two rivers were detected by LC-MS and GC-MS. The results indicated that at the five sampling points in the two rivers, NPEOs were the dominant pollutant in April and December with a similar distribution profile, and total NPEOs with different ethylene oxide lengths occurred at $6.9\text{-}97.6 \mu\text{g L}^{-1}$ in April and $2.5\text{-}52.7 \mu\text{g L}^{-1}$ in December. However, NP was the dominant pollutant in July with a concentration of $1.7\text{-}7.3 \mu\text{g L}^{-1}$. Corresponding drinking water samples derived from the river water suggested that the conventional water treatment process used in the five waterworks could remove NPEOs from the source water with high removal efficiency ($>99\%$). 4-NP removal efficiency, however, varied in the range of 62% to 95%, leaving a significantly high concentration of NP (0.1 to $2.7 \mu\text{g L}^{-1}$) in drinking water in July.

Writer *et al.* (2010) reported concentrations in the ng L^{-1} range in Minnesota lakes without wastewater treatment effluents. NP concentrations measured for estuaries and coastal areas were much lower than those of certain freshwater sites receiving sewage inputs. David *et al.* (2009) reviewed NP concentrations in the $0.000002\text{--}4.1 \mu\text{g L}^{-1}$ range found for seawater. The most contaminated sites were estuaries and coastal areas related to sewage treatment plants or industrial waste discharges. The authors concluded that the analysis of the results did not reveal considerable differences in AP concentration in seawater between European and Asian sites. Li *et al.* (2005) found NP concentrations in Saemangeum Bay (Korea) below detection levels to $298 \mu\text{g L}^{-1}$ with high levels in summer season. NP concentration was mainly affected by salinity and diffusion phenomena of seawater. Oros *et al.* (2003), and Jackson and Sutton (2008) reported detection of NP at 0.004 ng L^{-1} in a single water sample and $0.024\text{--}6.25 \mu\text{g L}^{-1}$ in water samples from San Francisco Bay.

A few measurements of APs in rain water have been undertaken (Bergé *et al.*, 2012). NP concentrations in rain water and snow were found to reach between 0.03 and $1.20 \mu\text{g L}^{-1}$, suggesting that wet deposition must be considered as a major source of NP in the environment. In Europe, data show NP concentrations in rain water are on the decline, which implies that the environment in European countries is exposed to decreasing NP contamination (Bergé *et al.*, 2012).

The presence of APs in industrial wastewaters is less well-documented (Berryman *et al.*, 2008; Bergé *et al.*, 2012; Sancey and Crini, 2012). Bergé *et al.* (2012) indicated industrial NP levels in the 0.13--

$200 \mu\text{g L}^{-1}$ range, *i.e.*, twice as high as levels in residential wastewater.

More detailed information on the presence of APs and APEOs in river water, groundwater, coastal and marine ecosystems, can be found in the reviews of Ying *et al.* (2002), Ying (2006), Corvini *et al.* (2006), Soares *et al.* (2008), David *et al.* (2009), and Bergé *et al.* (2012).

3.2.4 Alkylphenol elimination by existing wastewater treatment systems

Wastewater treatment plants (WWTPs) receive raw wastewater from domestic and/or industrial discharges. The objective of a wastewater treatment system is to remove mainly phosphorus, nitrogen and organic substances. The activated sludge process (ASP) is the treatment system most widely used in the world because its competitive cost and high efficiency are the two key considerations for its application. For instance, biodegradation using an ASP has proven to be the most cost-effective processes as this method successfully removes the bulk of the organic contaminants that enter the works. In an ASP used in WWTPs, after pretreatment and primary physicochemical steps, the biological degradation in a secondary settling tank (the biomass concentration in the mixed liquor depends on its capacity) is used to remove ‘all contaminants’ from wastewater. Currently, under optimized conditions, more than 90-95% of substances can be eliminated by conventional biological-based methods used in WWTPs (Li *et al.*, 2000; Cases *et al.*, 2011). Treated sludge after stabilization is then often disposed of in the soil or reused for agricultural purposes: in EU-27, 53% of sludge is used in agriculture directly or after

composting (Kelessidis and Stasinakis, 2012).

An important conclusion can be drawn. Although the existing conventional urban and industrial wastewater treatment plants were not designed for emerging compounds, numerous works have shown that emerging compounds such as EDCs can also be reduced by the treatment system used in the wastewater treatment plants, in particular in the WWTPs (Johnson and Sumpter, 2001; Wintgens *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2002; Gallenkemper *et al.*, 2003; Petrovic *et al.*, 2003; Corvini *et al.*, 2006; Gültekin and Ince, 2007; Soares *et al.*, 2008; Bolong *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Bergé *et al.*, 2012). It is important to note that APs are poorly soluble hydrophobic compounds and present a strong affinity for the particulate phase (sludge). Besides biodegradation, adsorption to sludge is the most effective process. However, the majority of EDCs in wastewater is mainly regarded as removed by biodegradation and the removal efficiency was quite variable (Liu *et al.*, 2009). For instance, it should be mentioned that even for the same compounds, significant differences are often observed between different countries or even between different WWTPs in a same country. Johnson and Sumpter (2001) previously revealed that the essential sewage treatment such as activated sludge and biological trickling filters can rapidly convert aqueous organic compounds into biomass that is then separated from the aqueous phase by settlement. However, not all compounds were completely broken down or converted into biomass. For example, the steroid estrogens found in effluent are the products of incomplete breakdown of their respective parent compounds (Johnson and Sumpter, 2001). Wintgens *et al.* (2002), and Gallenkemper *et*

al. (2003), using toxicological evaluations, also indicated that WWTPs were not able to remove these novel substances sufficiently before disposing effluent into the environment. Liu *et al.* (2009) reported that EDCs (Aps, bisphenol A, *etc.*) were not completely removed by existing WWTPs and remained at fluctuating concentrations in effluent, so discharge of such effluent may be the main reason for the wide distribution and occurrence of EDCs in surface waters, ground waters, and even in drinking waters. Bouki *et al.* (2010) reported that NP adsorption by activated sludge biomass was very fast and that there was no significant difference in the adsorptive behavior of active and inactive biomass. NP accumulated in the biomasses reaching levels up two orders of magnitude higher than the equilibrium water phase concentration, and this was due to the hydrophobic nature of both contaminant and biosolids. Desorption of NP from biomass was possible to a significant extent at pH 12 and above, and this may have implications for lime stabilized sludge. Data on the treatment of APs in industrial wastewaters is not documented (Sancey and Crini, 2012).

3.2.5 Alkylphenol elimination from wastewaters and water

Another important problem must also be pointed out. From the water and wastewater treatment point of view, no appropriate methods have been developed to deal with these contaminants on the urban or industrial scale. The methodology involves nothing new. For the treatment of industrial wastewater, the challenge comes rather from the optimal use and intermingling of the existing solutions with a tendency to minimize effluent discharge

(Chen *et al.*, 2013). Another problem is treatment of waters and wastewaters containing very low concentrations of substances. It should also be noted that industrial wastewaters differ significantly from WWTP and drinking water sources (usually rivers, lakes, or reservoirs) in one important way: the contaminant levels in most WWTP and drinking water sources are quite low as compared with contaminant levels in wastewaters derived from industrial-type activities. Wastewater treatment is a much more complicated process than water treatment due to highly polluted wastewater characteristics. However, the methods used for water are equally valid for wastewater, and the three main technologies proposed are membrane-, adsorption- and oxidation-based processes. As shown in [Table III.20](#), during the last decade, several wastewater treatment methods were reported and used for the attempted removal of APs not only from synthetic solutions but also from real effluent. In general, a combination of these methods is often the best option to achieve the desired water quality.

3.2.5.1 Removal of APs by membrane-based processes

During the three last decades, membrane separation processes have evolved from simple laboratory methods to large-scale operations with a significant

technical and commercial impact (Cicek, 2003). Nowadays, membrane processes are considered as an efficient technology for water treatment because of the possibility to obtain better water quality in more compact WWTP, easier to automate with less sludge production and greater cost-effectiveness as compared to conventional processes

(coagulation/flocculation/sedimentation/filtration combined with a carbon step and/or a chemical oxidation). Compared to other methods, their remarkable advantages are the high quality of effluent from a chemical point of view and the removal of microbes and viruses without chemical disinfection. Membrane filtration also provides the potential to reuse the wastewater. Drinking water is potentially the major application of membrane-based process mainly due to the recently more stringent drinking water regulations which make conventional treatments inadequate for treating emerging contaminants. However, recent studies have also shown that industrial wastewaters can also be treated efficiently using membrane technology (Crini and Badot, 2007). The technologies proposed for alkylphenol treatment include membrane treatment using biological (membrane bioreactors) or physical processes (membrane filtration such as nanofiltration).

Table III.20. Principal processes for APs removal proposed in the literature and discussed in this review (selected papers).

Technology	Compound(s) studied	Source
Activated sludge	NP, 4-OP, 4-t-OP	Johnson and Sumpter, 2001 ; Tanghe <i>et al.</i> , 1998 ; Bouki <i>et al.</i> , 2010 ; Cases <i>et al.</i> , 2011
Adsorption and biodegradation on microalgae	NP	Gao <i>et al.</i> , 2011a,b
Adsorption onto activated carbon	AP, 4-NP	Paune <i>et al.</i> , 1998 ; Abe, 1999 ; Iwasaki <i>et al.</i> , 2002 ; Choi <i>et al.</i> , 2005 ; Yu <i>et al.</i> , 2008, 2009a,b ; Liu <i>et al.</i> , 2009 ; Xing <i>et al.</i> , 2009
Adsorption onto algae	NP	Gao <i>et al.</i> , 2011a,b ; Peng <i>et al.</i> , 2012
Adsorption onto alginate	APs	Pluemsab <i>et al.</i> , 2007 ; Gao <i>et al.</i> , 2011b
Adsorption onto biomass	APs	Lang <i>et al.</i> , 2009 ; Gao <i>et al.</i> , 2011a
Adsorption onto chitosan	NP, 4-NP, 4-n-NP	Yamada <i>et al.</i> , 2006, 2009
Adsorption onto clays	APs, NPEOs	Barhoumi <i>et al.</i> , 2003 ; Nagasaki <i>et al.</i> , 2003 ; Espantaleon <i>et al.</i> , 2003
Adsorption onto cyclodextrins	APs, APEOs, NP, NPEOs, 4-NP, 4-NPEO, 4-n-NP	Murai <i>et al.</i> , 1996 ; 2006 ; Aoki <i>et al.</i> , 2003, 2004 ; Pluemsab <i>et al.</i> , 2007 ; Bonenfant <i>et al.</i> , 2009, 2010 ; Sancey and Crini, 2012
Adsorption onto magnetic particles	NP	Kurinobu <i>et al.</i> , 2007 ; Niu <i>et al.</i> , 2012
Adsorption onto silica gels	NP, NPEOs	Inumaru <i>et al.</i> , 2000 ; Nikolenko <i>et al.</i> , 2002
Adsorption onto synthetic resins	NPEOs, NP10EO	Yang and Ren, 2010; Fan <i>et al.</i> , 2011, 2012
Advanced oxidation processes	NP	Gültekin and Ince, 2007 ; Liu <i>et al.</i> , 2009 ; Oller <i>et al.</i> , 2011 ; Rizzo, 2011
Bacterial aerobic degradation	4-NP, NPEOs	Fujii <i>et al.</i> , 2003 ; Soares <i>et al.</i> , 2003a,b, 2006 ; Di Gioia <i>et al.</i> , 2004, 2008, 2009 ; Bertin <i>et al.</i> , 2007
Biosorption on dead biomass	NP	Lang <i>et al.</i> , 2009
Biodegradation	APs, NP	Soares <i>et al.</i> , 2003a,b, 2006 ; Corvini <i>et al.</i> , 2006 ; Cabana <i>et al.</i> , 2007 ; Patureau <i>et al.</i> , 2008 ; Balabanic <i>et al.</i> , 2012
Coagulation	APs	Wada <i>et al.</i> , 1995 ; Ciorba <i>et al.</i> , 2002 ; Chen <i>et al.</i> , 2013
Combined oxidation-adsorption processes	NP	Johnson and Sumpter, 2001 ; Tanghe and Verstraete, 2001 ; Johnson <i>et al.</i> , 2005 ; Jones <i>et al.</i> , 2007 ; Liu <i>et al.</i> , 2009 ; Sancey and Crini, 2012
Combined oxidation-biological processes	NP	Oller <i>et al.</i> , 2011 ; Rizzo, 2011
Combined adsorption-biological processes	NP, NPEO	Bertin <i>et al.</i> , 2007
Electrocoagulation	NPEOs	Ciorba <i>et al.</i> , 2002

Table III.20. (*continued*).

Technology	Compound(s) studied	Source
Enzymatic biodegradation	NP	Cabana <i>et al.</i> , 2007
Enzymatic removal	APs	Yamada <i>et al.</i> , 2006, 2009
Flocculation	NPEO	Jones and Westmoreland, 1998, 1999
Membrane bioreactor	NP, NPEOs, 4-OP, 4-t-OP	Li <i>et al.</i> , 2000 ; Wintgens <i>et al.</i> , 2002,2003,2004 ; Lyko <i>et al.</i> , 2005 ; Cases <i>et al.</i> , 2011 ; Camacho-Munoz <i>et al.</i> , 2012
Nanofiltration	NP	Kiso <i>et al.</i> , 2000 ; Wintgens <i>et al.</i> , 2002,2003,2004 ; Gallenkemper <i>et al.</i> , 2003 ; Jung <i>et al.</i> , 2007 ; Agenson <i>et al.</i> , 2007 ; Liu <i>et al.</i> , 2009
Ozonation	NP, 4-NP, NPEO, NP1OE, NP2OE	Ike <i>et al.</i> , 2002 ; Petrovic <i>et al.</i> , 2004 ; Kim <i>et al.</i> , 2005 ; Ning <i>et al.</i> , 2007a,b ; Gültekin and Ince, 2007 ; Baig <i>et al.</i> , 2008 ; Zhang <i>et al.</i> , 2008 ; Bertanza <i>et al.</i> , 2010a,b ; Tehrani-Baga <i>et al.</i> , 2012 ; Balabanic <i>et al.</i> , 2012
Photocatalysis	NP, NP1OE, NP2OE, 4-OP	Sherrard <i>et al.</i> , 1996 ; Castillo <i>et al.</i> , 2001 ; Ike <i>et al.</i> , 2002 ; Gültekin and Ince, 2007 ; Belgiorino <i>et al.</i> , 2007 ; Yamasaki <i>et al.</i> , 2008 ; de la Fuente <i>et al.</i> , 2010 ; Zhang <i>et al.</i> , 2012 ; Balabanic <i>et al.</i> , 2012
Photolysis	NPs, NPEOs	Ahel <i>et al.</i> , 1994b ; Neamtu <i>et al.</i> , 2006 ; Gültekin and Ince, 2007 ; Chen <i>et al.</i> , 2007
Reverse osmosis	NP	Wintgens <i>et al.</i> , 2003, 2004 ; Balabanic <i>et al.</i> , 2012
Sludge anaerobic digestion	NP	Stasinakis, 2012
Sonochemistry	NP	Yim <i>et al.</i> , 2003 ; Gültekin and Ince, 2007 ; Ince <i>et al.</i> , 2009

As already mentioned, the performance of an activated sludge process is variable. An additional tertiary treatment can then be added to achieve lower pollutant levels in the liquid stream in terms of total suspended solids (SS) and chemical oxygen demand (COD). Another solution consists of using membrane bioreactor (MBR) technology and the quality of the effluents obtained in these plants is similar to that obtained in a combined treatment by a conventional ASP and a tertiary step (Cicek, 2003; Cases *et al.*, 2011). In recent years, particular attention has been paid to the impact of MBR technology on emerging pollutants. MBRs are able to operate at higher biomass concentrations obtaining a better permeate quality due to membrane separation by filtration (microfiltration or ultrafiltration). MBR systems are also considered to be among the most promising technologies in microbiological wastewater treatment due to the fact that the long life of the sludge gives the bacteria time to adapt to the treatment-resistant substances.

The results published by Li *et al.* (2000) showed that, compared to WWTPs, membrane-assisted biological treatment improved the efficiency of eliminating NP and NPEOs. Similar conclusions were recently reached by Cases *et al.* (2011) for 4-OP and 4-t-OP removal. Previous work in lab-scale activated sludge units by Tanghe *et al.* (1998) showed that NP at an initial concentration of 8.33 mg L⁻¹ was almost totally removed and biodegraded. The results were temperature dependent: by lowering the temperature, elimination capacities decreased. Aeration was also a key factor in the fate of NP, and removal was shown to be highly dependent on the absence of anoxic zones.

Wintgens and co-workers (Wintgens *et al.*, 2002, 2003, 2004; Gallenkemper *et al.*,

2003; Lyko *et al.*, 2005) carried out various studies to challenge the fact that membrane-based technology was an effective barrier to endocrine disrupting compounds including APs. The removal techniques studied were MBR, nanofiltration (NF), reverse osmosis (RO), activated carbon adsorption and ozonation (Wintgens *et al.*, 2003, 2004). Investigations were conducted on effluents from landfill leachate treatment plants where input NP concentrations were detected in high mg L⁻¹ ranges. MBRs were capable of removing more than 80% of the NP load (Wintgens *et al.*, 2003). RO treatment proved to be less effective in NP removal than MBR. In another study of the removal of endocrine disrupters present in the outflow from a landfill leachate treatment plant, using an MBR system that comprises three bioreactors and an external ultrafiltration unit followed by granular activated carbon adsorption, they reported the elimination of more than 90% of NP (Wintgens *et al.*, 2002). The MBR was the most effective process step while the carbon treatment, applied downstream, was a further polishing step. The choice of membrane type was crucial. Studying eleven different membranes with the laboratory set-up, they observed that retentions for NP and bisphenol A ranged between 70% and 100%. Gallenkemper *et al.* (2003) also demonstrated that NF provided high quality permeates in water and wastewater treatment containing NP and bisphenol A with similar retention. Lyko *et al.* (2005) reported that the characteristics of influents (landfill leachate or municipal wastewater) had an effect on the composition of the activated sludge and thus had an associated impact on the efficiency of the membrane unit on micropollutant rejection. When the MBR effluent was compared to a conventional effluent loaded with suspended

matter, improved elimination can be expected due to the particle-free effluent quality. Wintgens and co-workers concluded that MBRs were a promising process combination of activated sludge and membrane filtration for wastewater treatment and reuse, and biological degradation was the most important step in the process. A vast number of options can be envisaged, *e.g.* artificial groundwater recharge, indirect potable reuse, industrial process water production.

Camacho-Munoz *et al.* (2012) studied the effectiveness of MBRs as advanced treatment on the removal of NP and NPEOs in WWTPs during a one-year monitoring study. The system studied operated with flat sheet and hollow fibre membranes in two parallel lines. Moreover, a RO module connected in series after the hollow fibre membrane was evaluated for one month. MBR and conventional ASP were also compared, as well as the influence of the physicochemical properties of the compounds on the removal rates achieved. No significant difference of effectiveness was found between flat sheet and hollow fibre membranes. However, an improvement was obtained with the addition of a RO module. Biodegradation has been shown to be the main route involved in the removal of organic compounds during both technologies.

Nanofiltration and reverse osmosis for AP removal were also proposed by Kiso *et al.* (2000), Agenson *et al.* (2007), and Jung *et al.* (2007). For example, Kiso and co-workers (Kiso *et al.*, 2000) studied the behavior of ten kinds of APs adsorbed on the membrane polymer (polyamide). Their results showed that desalting membranes, including reverse osmosis membranes, were necessary for the effective removal of the APs. As expected, the adsorption was

mainly controlled by the hydrophobic interaction.

3.2.5.2 Removal of APs by biotechnological-based methods

Another interesting biologically-based technology uses packed bed biofilm reactors which maintain a high biomass concentration and activity during the treatment minimizing, at the same time, start up operations and cell washout (Soares *et al.*, 2003a, b, 2006). In addition, bioreactors display high tolerance versus very high and variable organic loads. Soares *et al.* (2003a) tested a packed bed bioreactor, with 170 ml glass bead carriers and 130 mL medium for NP removal with a *Sphingomonas sp.* The bioreactor was first continuously fed with medium saturated with NP in an attempt to simulate groundwater pollution. At best, nonylphenol was degraded by 99.5% at a feeding rate of 69 ml h⁻¹ and a removal rate of 4.3 mg nonylphenol day⁻¹, resulting in a 7.5-fold decrease in effluent toxicity according to the Microtox test. The bioreactor was then fed with soil leachates at 69 ml h⁻¹ from artificially contaminated soil (1 g nonylphenol kg⁻¹ soil) and a real contaminated soil (0.19 g nonylphenol kg⁻¹ soil). Nonylphenol was always completely removed from the leachates of the two soils. It was removed to 99% from the artificial soil but only 62% from real contaminated soil after 18 and 20 d of treatment, respectively, showing limitation due to NP adsorption. The authors demonstrated that it was possible to develop a continuous biofilm reactor with a *Sphingomonas sp.* Strain capable of removing 4-NP from groundwater (Soares *et al.*, 2003b). In another study, the authors set up a mixed packed bed reactor capable of removing 4-NP mixtures at temperatures below 15°C

(Soares *et al.*, 2006). This was the first reported case of cold-adapted microorganisms capable of mineralizing NP.

Other interesting results using biotechnological systems for NP removal have been reported. Fujii *et al.* (2003) developed a lab-scale packed-column reactor inoculated with a bacterial consortium for NP elimination. *Sphingomonas cloacae* S-3T was isolated from wastewater from a sewage treatment plant in Tokyo in 2000. In flask-scale experiments, S-3(T) cells immobilized on porous polypropylene carriers (beads) efficiently degraded NP to concentrations routinely measured in aquatic environments [a few parts per billion (ppb), or micrograms per liter]. The system worked properly and consistently removed several hundred ppb of NP to ecologically safe concentrations of less than 10 ppb in industrial wastewater without the addition of nutrients. The effect of wastewater pH on the system performance was also evaluated and wastewater samples with pH values of 6 or 8 were treated efficiently without pH adjustment. These results suggest that a biotreatment system using NP-degrading bacteria can efficiently remediate industrial wastewater and contribute to the preservation of aquatic environments.

Di Gioia and co-workers (Bertin *et al.*, 2007; Di Gioia *et al.*, 2008) developed a set of parallel batch immobilized cell bioreactors, packed with different materials (silica beads, granular activated carbon, glass spheres), and inoculated with a *Pseudomonas sp.* Strain for the treatment of water artificially contaminated with NPEO (synthetic solutions at concentrations in the range 30-90 mg L⁻¹). The results indicated a remarkable decontamination potential and microbial stability along with biodegradation performances higher than those displayed by freely suspended cells of

the same strain. The three biofilm reactors, tested under batch conditions, showed comparable degradation capabilities and specificities, being able to remove from 77 to 99% of the load after 9 days of batch treatment. Biofilm grew well and homogeneously on the packed beds of the three reactors. NPEOs were mostly removed through biodegradation, as suggested by the accumulation of two metabolites typical of NpnEO aerobic biodegradation, *i.e.* phenol and 4-nonylphenol, and by the low amounts of NPEO recovered from the reactors at the end of the study. However, NPEO degradation was not complete and trace amounts of 4-NP persisted in the reactors at the end of the treatment. In order to use more efficient biocatalysts, the same group proposed to use an aerobic bacterial consortium obtained from textile wastewater capable of degrading both 4-NP and NPEOs (Di Gioia *et al.*, 2004, 2008, 2009). The consortium was composed mainly of Alfa and Gammaproteobacteria, with a high percentage of members of the *Pseudomonas* genus among the latter group (Di Gioia *et al.*, 2008). Packed bed reactors were developed at the lab-scale by immobilizing the consortium on silica beads or granular activated carbon. NP concentration at 100 mg L⁻¹ was the sole carbon and energy source in the system. The consortium was able to colonize both supports and, in continuous mode, the films that formed showed a remarkable stability. Interesting degradation percentages were obtained (80-97%). Both reactors displayed comparable NP mineralization under batch and continuous conditions. The immobilization support influenced the overall biodegradation potential of the immobilized culture. The authors concluded that biotechnological processes could represent an effective alternative to physical (adsorption) and/or chemical (ozonation,

photolysis) treatments for the decontamination of effluents and solutions containing NPs and related compounds.

Cabana *et al.* (2007b, c) proposed cross-linked laccase aggregates for the elimination of NP, bisphenol A and triclosan. This type of immobilization involves the precipitation of the enzyme and the chemical cross-linking of the protein using bifunctional compounds. Cross-linking prevented the dissolution and possible loss of aggregates after removing the precipitating agent. This resulted in laccase stabilization against thermal and chemical denaturation and in modifications of the kinetic behaviour. Their results showed that a 100-mL reactor with 0.5 mg of material operated continuously at a hydraulic retention time of 150 min at room temperature and pH 5 could remove all three EDCs from a 5 mg L⁻¹ solution. The authors noted that the use of immobilized enzymes such as laccase operating in a continuous fluidized bed reactor was an effective biotechnological way of eliminating NP from aqueous waste. In another study (Cabana *et al.*, 2009), laccase from a strain of the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* was immobilized covalently on the diatomaceous earth support Celite using different strategies. A first approach involved the sequential activation of the support surface with gamma-aminopropyltriethoxysilane followed by the reaction of the functionalized surface with glutaraldehyde (GLU) or glyoxal (GLY) and the immobilization of laccase on the activated surface. Another strategy tested the simultaneous internal cross-linking of the protein with GLU or GLY and the immobilization of the laccase on the silanized surface. The two strategies were modified to test the impact of the concomitant addition of bovine serum albumin (BSA) as stabilizing agent during the immobilization steps. The highest

laccase activity and the greatest degree of activity recovery (tested using 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) as the substrate) were achieved by the sequential immobilization procedure using GLU as the cross-linking agent. The solid catalysts featuring internal cross-linking of the protein showed significantly higher stability against several denaturants. The biocatalyst formed using GLU in the sequential procedure was applied in a packed bed reactor for the continuous treatment of 5 mg L⁻¹ solutions of NP, bisphenol A (BPA) and triclosan (TCS) through repeated batch treatments. All of these EDCs were eliminated at a contact time of less than 200 min by using 3.75 units of laccase activity for BPA and TCS and 1.88 U for NP. These elimination performances were maintained over five consecutive treatment cycles using the same biocatalyst. This system was also able to remove the EDCs from 100 mg L⁻¹ solutions. Kinetic measurements showed a decreasing affinity of the solid biocatalyst for NP, TCS and BPA in that order. The authors concluded that laccase immobilization was a promising tool to increase the applicability and reusability of laccase in biotechnology for EDC removal.

Patureau *et al.* (2008) studied several treatment processes of mixed sludge naturally contaminated with nonylphenol ethoxylate (NPEO) in order to evaluate their efficiency for the removal of these substances. Anaerobic and aerobic treatments were carried out in continuous stirred tank reactors, operated separately or combined together, at mesophilic and thermophilic temperatures and with or without ozone post-treatment. Anaerobic mesophilic removal of NPEO led to complete removal of NP2EO, incomplete removal of NP1EO and non stoichiometric production of NP, with consequently NPEO removal of

25%. At thermophilic temperature, anaerobic digestion led to an increase of the total solids removal efficiency, while improving NPEO degradation (30%). Under thermophilic aerobic conditions, the three compounds were removed simultaneously with a NPEO removal efficiency higher than under anaerobic conditions (39%). This removal was always well correlated to the removal of total solids meaning that bioavailability remained the main limiting factor. Combination of either thermophilic aerobic-mesophilic anaerobic or mesophilic anaerobic-ozonation treatments enhanced NPEO removal by comparison to single systems (45% and 48%, respectively). These results confirmed the high potential of existing and up-graded sewage sludge treatments to degrade such refractory and aged compounds.

Numerous studies reviewed by Corvini *et al.* (2006) concerning NP biodegradation using microbiological systems were carried out at lab scale and under real conditions. The authors discussed NP biodegradation by axenic cultures of microorganisms and complex microbial communities, with specific attention to the structure of the alkyl chain. Among the bacteria able to degrade NP, sphingomonads were very interesting microorganisms for metabolic studies due to the unusual mechanisms involved in the degradation pathway.

3.2.5.3 Removal of APs by adsorption-oriented processes

Adsorption on synthetic or natural adsorbents has also been proposed for AP removal. These include carbons (Paune *et al.*, 1998 ; Abe, 1999 ; Iwasaki *et al.*, 2002 ; Choi *et al.*, 2005 ; Yu *et al.*, 2008, 2009a,b ; Liu *et al.*, 2009 ; Xing *et al.*, 2009), silica gels (Inumaru *et al.*, 2000 ; Nikolenko *et al.*, 2002), clays (Barhoumi *et al.*, 2003 ;

Nagasaki *et al.*, 2003 ; Espantaleon *et al.*, 2003), hypercrosslinked resins (Yang and Ren, 2010 ; Fan *et al.*, 2011, 2012), cyclodextrins (Murai *et al.*, 1996 2006 ; Aoki *et al.*, 2003, 2004 ; Pluemsab *et al.*, 2007 ; Bonenfant *et al.*, 2009,2010 ; Sancey and Crini, 2012), biomass (Lang *et al.*, 2009 ; Gao *et al.*, 2011a), biosorbents such as chitosan (Yamada *et al.*, 2006, 2009), alginate (Pluemsab *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2011b), and algae (Gao *et al.*, 2011a,b ; Peng *et al.*, 2012), and magnetic particles (Kurino *et al.*, 2007 ; Niu *et al.*, 2012).

Iwasaki *et al.* (2002) studied the adsorption of APs with alkyl chains consisting of 5-9 carbon atoms onto microporous activated carbons (AC) prepared from coconut shells under different activation times. They showed that all APs were strongly adsorbed by all microporous carbons. The results indicated that adsorption ability increased mainly with activation time. The amount of 4-NP adsorbed increased with the porosity and specific surface area of the carbon used. In either APs with linear alkyl chains (heptyl > hexyl > pentyl) and those with branched alkyl chains (nonyl > octyl), the amount adsorbed increased with the number of carbon atoms. This was attributed to a molecular sieving effect. Abe (1999), and Choi *et al.* (2005) reported a similar efficiency of AC for NP removal. Removal performances were also studied using a lab-scale carbon fixed bed. Data showed that NP with a high K_{ow} value could be effectively removed.

Xing *et al.* (2009) proposed ordered mesoporous carbons with varying pore sizes synthesized using ordered mesoporous silica as hard templates for NPEO removal. As evidenced by adsorption tests, the isotherms of NPEO on material were well simulated by a Langmuir adsorption model. The

surface area of a pore larger than 1.5 nm, was found to be a crucial factor for the adsorption capacity of NPEO, while the most probable pore diameter of a material was found to be vital to the adsorption rate of NPEO. Results also showed that adsorption temperature had larger effects on adsorption rate than on adsorption capacity. Theoretical studies show that the adsorption kinetics can be well depicted using a pseudo-second-order kinetic model.

Yu *et al.* (2008) studied the adsorption of carbamazepine and NP on activated carbon. The results showed that, at low concentrations (10-800 ng L⁻¹), removal of the target compounds was contrary to expectations based on their hydrophobicity. Nonylphenol (logK_{ow} 5.8) was most poorly adsorbed, whereas carbamazepine (logK_{ow} 2.45) was most adsorbable. In other works (Yu *et al.*, 2009a,b), the same group investigated the adsorption of NP on granular activated carbons with the objective to investigate preloading effects by natural organic matter (NOM) on adsorption capacity and kinetics under conditions and concentrations (*i.e.*, ng L⁻¹) relevant for drinking water treatment. Isotherms demonstrated that NP was significantly negatively impacted by NOM fouling. The carbon with the widest pore size distribution had considerably greater NOM loading, resulting in lower adsorption capacity. Model predictions and experimental data were in good agreement for NP compounds, which demonstrated the effectiveness and robustness of the pore and surface diffusion model used in combination with the time-variable parameter approach for predicting removals at environmentally relevant concentrations (Yu *et al.*, 2009b).

Inumaru *et al.* (2000) proposed octylsilane-grafted hexagonal mesoporous silica for low-concentration nonylphenol

removal. They showed that the adsorbent exhibited high efficiency comparable to that of activated carbon.

Espantaleon *et al.* (2003) proposed a method of oriented-adsorption onto clays to reduce the pollution of effluents produced in tanning. Natural bentonite activated with 0.5 M H₂SO₄ was the most effective adsorbent for NPEO. The authors concluded that the process with clays could constitute a simple, selective and economical alternative to conventional physical-chemical treatments.

Nagasaki *et al.* (2003) studied the adsorption of NP on Na-montmorillonite using a batch experiment. They compared the results with those obtained using α -SiO₂, α -Al₂O₃ and gibbsite. It was found that NP adsorption on Na-montmorillonite reached the equilibrium state within 24 h, and that the interlayer width of Na-montmorillonite did not change before and after the sorption. These data suggest that NP was adsorbed on the outer surface of Na-montmorillonite. The amount of NP adsorbed on the surface of octahedral sheets of Na-montmorillonite was found to be identical to that adsorbed to gibbsite. On the other hand, adsorption on α -Al₂O₃ was smaller, and that on α -SiO₂ was very low. Adsorption amount was found to increase monotonously with pH. It was noted that NP was adsorbed on the broken edges of the octahedral alumina sheets of Na-montmorillonite.

Yang and Ren (2010) proposed hypercrosslinked polymers for the adsorption of NP10EO from aqueous solutions. The results showed that the amount adsorbed depends on the specific surface area, the pore size of the polymer, and also the temperature of the solution. Thermodynamic analysis indicated that the adsorption process was characterized by an

interaction of the hydrophobic part of the surfactant molecule with the surface of the polymer and by the formation of micelles.

Fan *et al.* (2011) recently evaluated synthetic porous resins as adsorbents for phenol, bisphenol A and NPEO removal from aqueous solutions. The resins used were hypercrosslinked aminated polymers. Several interactions were proposed to explain the adsorption mechanism, namely hydrophobic effects, π - π bonds, hydrogen bonding, steric effects, and electrostatic interactions. However, in the case of NP10EO adsorption onto polymeric adsorbents, the mechanism was mainly dependent on pore size and molecular morphology. The structure, surface area and functional groups of the polymer did not appear to play a role in the adsorption process. In another work, Fan *et al.* (2012) showed that the adsorption of NpnEO with shorter EO chains was greater than that of molecules with longer EO chains on the surfaces of resins, and the strength of the adsorption was affected by resin surface-surfactant and surfactant-surfactant lateral interactions. Lateral interactions were endothermic, and contributed more to the adsorption process on aminated resins than on hypercrosslinked resins. The surface interactions were mainly due to bonding between the hydrophobic moiety of the surfactant and hydrophobic surfaces of the resins without electrical interactions or hydrogen bonding, even on aminated resins.

Many reports also deal with the interaction of APs in solution with cyclodextrins (CDs), natural molecules derived from starch. These substances have a remarkable capacity to form inclusion complexes in solution or in the solid state with other molecules through host-guest interactions (Morin-Crini and Crini, 2012). Murai *et al.* (1996) previously studied the

adsorption of nonionic surfactants and ionic surfactants on cyclodextrin-based gels. They showed that one gram of material was able to adsorb 85% of APEO from a 150 mL solution containing 200 ppm of nonionic surfactant. In another work, Murai *et al.* (2006) showed that according to the adsorption isotherms of 4-NP and 4-NPEO, their adsorption onto cyclodextrin polymer was dependent on the length of the ethoxylates in the NPEO. As the ethoxylate chain of NPEO became longer, the efficiency of adsorption onto materials decreased. Column adsorption and desorption tests revealed that the compounds adsorbed were successfully released by various kinds of aqueous alcohol solutions.

Aoki *et al.* (2003, 2004) proposed an insoluble cross-linked chitosan bearing cyclodextrin moieties for the adsorption of p-nonylphenol and bisphenol A. The material proposed adsorbed bisphenol A quicker than p-nonylphenol and interesting adsorption capacities were reported (Aoki *et al.*, 2003). Almost all of the bisphenol A and 4-nonylphenol adsorbed was released from the beads by treatment with 50% aqueous ethanol solution (Aoki *et al.*, 2004).

Bonenfant *et al.* (2009, 2010) showed that NP removal by cyclodextrin was rapid and the polymer exhibited high nonylphenol 9-ethoxylate (NP9EO) adsorption capacities (1.1-6.8 mg of NP9EO per g of polymer). They concluded that cyclodextrin-based gels were interesting adsorbents for the removal of nonionic surfactants such as APEO from aqueous solutions.

There is no doubt that the use of advanced technologies based on chemical oxidation (namely AOPs for Advanced Oxidation Processes) is considered a highly competitive wastewater treatment technology for the removal of those organic compounds not treatable by conventional

techniques due to their high chemical stability and/or low biodegradability (Gültekin and Ince, 2007; Belgiorno *et al.*, 2007; Rizzo, 2011). However, treatment for complete mineralization is generally expensive because the oxidation intermediates formed during chemical oxidation tend to become increasingly resistant to their complete chemical degradation. One attractive potential alternative is to apply AOPs in a pre-treatment to improve conventional treatment of industrial wastewater. Sancey and Crini (2012) recently showed that, an AOP pre-treatment combined with an adsorption-oriented process using a cyclodextrin derivative, was a highly efficient treatment for industrial wastewater containing recalcitrant molecules such as NP. The combined process consisting of cyclodextrin-based adsorption of pre-oxidized discharge water was interesting for the removal of recalcitrant organic compounds present in metal surface-treatment wastewaters.

Pluemsab *et al.* (2007) proposed calcium alginate beads covalently linked with alpha-cyclodextrin for their ability to serve as a supporting matrix for bacterial degradation of NP. The results from column chromatographic experiments showed that the material exhibited a strong affinity for NP adsorption. Although addition of cyclodextrin to the culture broth of *Sphingomonas cloacae* retarded NP degradation, the bacteria immobilized on the cyclodextrin-alginate beads were effective for the degradation. Batch degradation tests using the bead-immobilized bacteria showed 46% NP recovery after a 10-day incubation at 25°C, and recovery reached to about 17% when wide shallow incubation tubes were used to facilitate uptake of the viscous liquid NP on the surface of the medium. Scanning

electron microscopic photographs revealed that multiplying bacteria were present both on the surface and inside the beads but that the cyclodextrin-alginate matrix was stable and suitable for 10-day incubation.

Lang *et al.* (2009) studied NP biosorption on chitosan-immobilized dead fungal beads. Chitosan, a biopolymer produced on an industrial scale by the deacetylation of chitin (the second most abundant biopolymer in nature) is commonly used as support material for biomass immobilization (Crini and Badot, 2008). Biosorption is the passive uptake of substances by non-growing or non-living microbial biomass such as bacteria, fungi and algae. In general, better removal of organic compounds was obtained with dead biomass than with live biomass. Lang *et al.* (2009) showed that the use of fungal biomass of *Rhizopus arrhizus* immobilized on chitosan beads enabled the effective and innovative treatment of recalcitrant pollutants such as NP. A maximum monolayer capacity of the beads was over 312 mg g⁻¹ and the process was rapid (40 min of contact time). The regeneration of used dead beads with methanol was effective for at least 4 batch cycles. The technology is also interesting because the biomass could be readily prepared on a commercial scale at very low cost.

Different *Chlorella* species presented the ability to remove NP rapidly and in large quantities as reported by Gao *et al.* (2011a). Among the species, *Chlorella vulgaris* enabled the highest NP elimination: nearly all NP was removed from the medium and more than 80% of NP was degraded after a short exposure time (other conditions: 25°C with light illumination, initial biomass between 0.5 and 1 mg chlorophyll L⁻¹). The mechanisms included initial rapid adsorption and uptake, followed by

accumulation and biodegradation. The biodegradation ability was species-specific and dependent significantly on growth conditions, particularly light. The authors concluded that, among the different microalgae, the *Chlorella* genus was able to efficiently remove NP from water and degrade it. In another study, Gao *et al.* (2011b) demonstrated that alginate-immobilized *Chlorella vulgaris* beads were more effective than freely suspended cells in removing NP from wastewater. The spiked NP, at an initial concentration of 1 mg L^{-1} , was almost completely removed ($>98\%$) under an optimal algal bead concentration (4 beads mL^{-1}) after 96h of exposure. The NP biodegradation efficiency was significantly enhanced through optimization of the cell density per algal bead and/or algal bead concentration per unit volume of medium. The method based on immobilization allows higher biomass concentrations and facilitates separation and non-destructive recovery of biomass from pollutant-bearing solutions.

Peng *et al.* (2012) also studied the adsorption characteristics of NP by algal *Chlorella vulgaris* suspensions. Experimental parameters affecting the adsorption process, such as pH, contact time and the effect of solvent were studied. The results showed that the data were well described by the Langmuir adsorption model and indicated that NP adsorption by biosorbent was high during the first 30 min, and equilibrium was achieved after a contact time of 60 min. Adsorption of NP was pH-dependent: as the pH decreased, the adsorption capacity increased. The authors also showed that the fluorescence intensity of NP decreased and that the fluorescence peak of NP moved towards the infrared when algae were added.

Kurinobu *et al.* (2007) proposed the use of magnetic photocatalyst particles with a core-shell structure of three layers coating Fe_3O_2 core particles with SiO_2 and TiO_2 for NP removal and degradation. NP adsorption on the magnetic photocatalyst particles was found to be effective. As the photocatalyst particles were magnetic, they were easily recovered.

Niu *et al.* (2012) prepared core/shell structured carbon-encapsulated magnetic nanoparticles (CMNPs) with a simple method using inorganic iron salt and glucose solution as precursor substance for 4-n-NP and 4-OP removal. The synthesis procedure did not require the use of organic solvents. The materials were efficiently adsorbed for AP removal from water samples. The mechanism of adsorption was mainly based on π - π stacking interactions, hydrophobic interactions and hydrogen bonding between substances and graphitic carbon.

Yamada *et al.* (2006, 2009) proposed enzymatic removal of APs from aqueous solutions through a two-step approach conversion of APs to quinines with mushroom tyrosinase. Subsequently the enzymatically generated quinine derivatives were adsorbed on chitosan beads at pH 7 and 45°C as the optimum conditions. This process was quite effective for 4-NP and 4-n-OP with removal values of 97-100%. Mushroom tyrosinase can effectively oxidize linear and branched APs into quinine derivatives (quinine conversion of branched APs was slower than that of linear compounds). The use of porous chitosan beads led to an increase in adsorption of enzymatically generated quinine derivatives, because quinine adsorption occurred heterogeneously at the solid-liquid interface. The use of *melB* tyrosinase was interesting because it offered quinine conversion without requiring H_2O_2 .

3.2.5.4 Removal of APs by advanced chemical oxidation-based technologies

Destruction processes using various oxidation systems appear to be more interesting. They are based on chemical techniques involving oxidation reactions. Chemical oxidation is increasingly used in the treatment of water. It is necessary when the water to be processed contains non-biodegradable pollutants refractory to conventional decontamination treatment. The treatment can be carried out either by standard oxidation procedures (chemical or catalytic, electrochemical oxidation), or using advanced oxidation processes (AOPs), which have appeared in recent years. In water and wastewater treatment, oxidation is useful as it enables partial destruction with standard procedures (resulting in COD and TOC reduction) or total destruction with AOPs of the organic matter (mineralization).

Classical chemical oxidation techniques are based on the use of various powerful oxidants such as ozone, in the presence of a catalyst or not. Ozonation is commonly used in a large number of water treatment plants not only as a clarifying and disinfecting agent (Gültekin and Ince, 2007), but also as an oxidizing agent with the aim to degrade/mineralize the organic matter. For instance, ozone is a strong oxidant and reacts easily with organic molecules which have sites with high electron densities involving double bonds – the preferred sites for ozone attack. This high reactivity then leads to rapid oxidation kinetics. The mechanism in ozonated waters is either direct oxidation by molecular ozone or indirect oxidation by hydroxyl radicals that are formed by the decomposition of ozone in alkaline conditions. However, ozone-based

processes have become the object of increasingly strict levels of legislation, especially their use in the final stages of mains water treatment (drinking water). Owing to its very strong oxidant activity, ozone has also become the most frequently used oxidant for the decontamination of industrial effluent – only fluorine has a higher oxidation potential. It enables the transformation of industrial compounds that are difficult to degrade into molecules much easier to deal with biologically for example. Another advantage of ozone is that it can be used to process large amounts of effluent with little or no formation of by-products (structures conjugated by ozone become non-toxic). However, the process does require a complex set-up. Ozone is an unstable oxidant with a short lifetime and as such must be used soon after it has been synthesised. It is produced on-site from oxygen using electric discharge. In addition, as ozone is expensive to produce, it is generally used on effluent that has been pre-treated in a biological or a physicochemical process. Its use can also be associated to that of other oxidants (such as H_2O_2), catalysts (metal oxides) or to other methods (UV irradiation, membrane filtration) in order to increase its oxidation throughput capacity. Hydrogen peroxide has also proved to be an excellent oxidant, without impact on the environment, and can be used in conjunction with ozone (Snyder *et al.*, 2006).

The high efficiency of AP removal during ozonation is well documented. Petrovic *et al.* (2004) studied the oxidative degradation of NPEOs in water using ozonation and electron beam irradiation with and without the addition of ozone as treatment processes. It was found that both ozonation and the two AOPs applied were able to decompose not only the NPEOs but also the polyethyleneglycols formed as by-

products from NPEO degradation to residual concentrations below the limit of detection. Moreover, the treatment processes were also used to study the oxidative degradation of nonylphenoxy acetic acid (NPEC) and of NP which were formed as by-products from biodegradation of NPEOs.

Ning *et al.* (2007a,b) proposed that ozonation be used to degrade NP and OP. Ozone has been found to react readily with both these APs, mainly in acid conditions (pH=2). Studying the reaction mechanism between ozone and these two APs, they suggested that an initial product of ozonation was hydroxyl-alkyl phenol.

Both NP and NPEO oxidation performance and kinetics were evaluated by Hyunook *et al.* (2007) under different operating conditions created by varying ozone doses, solution pH and molar ratios of $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$. For example, they demonstrated that at pH 7, more than 90% NP (initial NP concentration: 0.51 mg L^{-1}) can be removed by $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$. Over the pH range 5 to 9, NP was also effectively oxidized. NP destruction was also significantly increased when H_2O_2 was applied along with ozone. The authors concluded that ozonation could be very effective in oxidizing NP and NPEOs.

Sun *et al.* (2008) investigated the ozonation mechanism of 4-NP. Using GC-MS analyses, the following substances were identified: mixtures of 4-nonylbenzoquinone homologues, 4-nonylcatechol homologues and the carboxylic compounds formed. The estrogenic activity of ozonation by-products of 4-NP was studied using a recombinant yeast bioassay. The mixtures of 4-nonylcatechol homologues had higher estrogenic activity, while mixtures of 4-nonylbenzoquinone homologues had lower estrogenic activity than 4-NP. However, the

estrogenic activity of the 4-nonylphenol ozonation solution was ultimately eliminated. The removal of the estrogenic activity of 4-NP was enhanced by the addition of humic acid, indicating the favourable effect of the presence of natural organic materials in water treatment.

Ozone oxidation was proven by Baig *et al.* (2008) to be an effective solution for the degradation of selected oestrogenic active substances detected in secondary wastewaters such as 4-t-OP and 4-iso-NP, up to their limit of detection. The matrix-effect of wastewater was investigated performing ozone experiments under batch mode and continuous mode using drinking water and wastewater from a local plant both spiked with the non-detected substances. The results obtained indicated that the wastewater matrix greatly affected the kinetics of ozone reaction with these substances but did not really change the related reactivity scale. The ozone dose corresponding to the full conversion of target substances consequently increased as their oxidation took place competing with reactions of background pollutants represented by the COD content. However, a usual dose close to 12 mg L^{-1} was found sufficient to provide high degradation yields for all substances studied while 35% of the COD was removed.

Zhang *et al.* (2008) studied the ozonation of NP and OP in aqueous solutions containing acetonitrile as a cosolvent. Batch experiments were carried out to test the effects of initial pH values, ozone dosages, and initial APs concentration on degradation efficiency. At pH 9.0, the two APs were completely degraded after a period of 6 min. After 6 min for ozonation, the degradation efficiency of NP was nearly 42% with ozone dosage 0.13 mg min^{-1} at pH 6.5, but with

the ozone dosage of 0.38 mg min^{-1} , the degradation efficiency reached 96%. The effect of ozone dosage on degradation of OP showed that the higher the initial AP concentration, the lower the AP degradation efficiency. During the ozonation process, the rapid decrease of the pH and the sharp increase of the electrical conductivity indicated the formation of by-products with higher polarity, which was confirmed by HPLC analysis. The authors concluded that ozonation was a feasible process for removing APs from water.

Kim *et al.* (2005) compared ozonation and electrochemical degradation of NPs. Ozonation was efficient but they showed that electrochemical oxidation was also an interesting option for the treatment of NPEOs. The principal advantages were easy implementation, the possibility to operate in a wide range of treatment conditions and the fact that there was no need to store and dispense treatment reagents.

Bertanza *et al.* (2010a,b) reported that NP removal by conventional WWTPs is recognized but in order to reach very low concentrations, further treatment such as chemical oxidation might be required. They studied the ozonation of an effluent from an Italian WWTP (Verona, Italy) and the reaction was monitored using chemical and microbiological analyses. The authors concluded that ozonation was an economically feasible option as tertiary step.

Tehrani-Bagha *et al.* (2012) recently studied the efficiency of different UV-enhanced ozonation processes for degradation a nonylphenol ethoxylate with 40 oxyethylene units (200 mg L^{-1}) in lab scale experiments at ambient temperature. The reaction was monitored by the reduction of COD and TOC and by the absorbance band of the aromatic ring of the molecule. The results showed that a

combination of UV irradiation and ozonation was considerably more efficient than the individual processes (at least twice as efficient in terms of COD and TOC reductions). The synergistic effect of ozonation and UV irradiation was particularly pronounced when medium-pressure UV irradiation was used. By adding alkali to the solution, the efficiency of UV-enhanced ozonation increased with respect to COD reduction but decreased with respect to TOC reduction. This indicates partial oxidation with a lower degree of mineralization of the surfactant.

AOPs have also been widely explored for the decontamination of water polluted mainly by organic substances. These processes are used to complete the degradation initiated by biological treatment or as a pretreatment to enhance the biodegradability of recalcitrant or treatment-inhibiting compounds present in wastewaters. This enhancement is achieved by the partial oxidative degradation of the molecules to give intermediate reaction products that can be degraded by microorganisms in a biological post-treatment. AOPs can also be used as a treatment step to mineralize the compounds. For instance, in proper operation conditions, it is possible to mineralize the target pollutants to CO_2 , which is the most stable end product of chemical oxidation (Gültekin and Ince, 2007).

A wide variety of AOPs are available for wastewater treatment based on photocatalytic systems (TiO_2/UV , $\text{Fe}/\text{UV-Vis}$) or reactions that produce hydroxyl radicals by the photolysis of hydrogen peroxide and ozone ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, O_3/UV , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3/\text{UV}$). Photocatalysis is an oxidation process in which a metal oxide semiconductor (*e.g.* TiO_2) immersed in

water and irradiated by near UV light enables the formation of free hydroxyl radicals. TiO_2 is the most widely used catalyst because of its non-toxicity, low-cost, photo-stability and water insolubility under most environmental conditions (Belgiorno *et al.*, 2007). Photocatalytic reactions can be divided into heterogeneous and homogeneous processes that use either catalyst particles or coatings such as TiO_2 , or soluble catalysts or redox systems like iron ions or iron complexes. The light energy necessary can either be provided by lamps or solar radiation. Photocatalysis processes have been found to be effective for the degradation of EDCs as covered in the following reviews which can be consulted (Gültekin and Ince, 2007; Belgiorno *et al.*, 2007).

Sherrard *et al.* (1996) previously reported the degradation of NPE in aqueous solution (2L of aqueous solution containing 2 g L^{-1} NPE and 0.1% w/v TiO_2 catalyst) using heterogeneous photocatalysis. From their GC-MS, ESMS and NMR data, they concluded that photocatalysis was an efficient method. Intermediates were identified and suggested that the ethylene oxide chain was more susceptible to degradation than aliphatic or aromatic moieties.

Castillo *et al.* (2001) investigated the photodegradation of non-ionic surfactants (nonylphenol- and alcohol-polyethoxylates, NPEOx and CnEOx) in different waters (deionized water and industrial effluent) with and without a photoinducter (Fe(III)). The intermediates detected included NP2EO and nonylphenol ethoxy acetic acid (NPE2C). Much smaller amounts of NP9EO degradation products having only the alkyl chain carboxylated were also formed in the photocatalysis experiment. The C10EO6 photoproducts identified included fatty

alcohols and acids. PEGs were also formed. Photodegradation in wastewater samples was more efficient than in deionized water.

Yamazaki *et al.* (2008) investigated photocatalytic degradation of 4-OP by recirculating the aqueous solution through a packed bed reactor with TiO_2 . The kinetics of degradation was independent of the flow rate but a decrease in TOC became smaller as the flow rate increased. Under illumination for 6 h at a flow rate of 28.5 ml min^{-1} , 83.2% of 4-OP was degraded but 60.7% of the initial TOC remained. LC-MS measurements using electrospray ionization revealed the formation of byproducts. The degradation rate was remarkably accelerated by addition of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: 4-OP completely disappeared under irradiation for 2-4 h and in the presence of $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, 4-OP was degraded without TiO_2 , which was attributable to reactions involving SO_4^- radicals. The UV/ TiO_2 / $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ system was more suitable than UV/ $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ for the decontamination of water containing 4-OP.

The applicability of different photochemical AOPs, namely, direct UV-C photolysis, heterogeneous photocatalysis, and photo-Fenton reactions for the degradation of 300 mg L^{-1} NP9EO in water was studied by de la Fuente *et al.* (2010). Toxic 4-nonylphenol was never found as a byproduct of the degradation after any of the treatments. Aldehydes were formed in all of the processes, but they appeared at low levels in photo-Fenton reactions. Photo-Fenton treatments were considered to be the best degradation processes.

Zhang *et al.* (2012) recently studied the application of TiO_2 photocatalysis in advanced wastewater treatment to simulate the removal of endocrine disrupting compounds (bisphenol A, NP, estrone, and 17 alpha-estradiol) and estrogenic activity from secondary effluents of a municipal

wastewater treatment plant, aiming to evaluate the possibility of using photocatalysis for advanced wastewater treatment. The removal efficiencies of alkylhydroxybenzenes (bisphenol A, NP) by traditional processes in wastewater treatment were more sensitive to temperature than removal of steroid hormones (estrone, and 17 alpha-estradiol), resulting in a risk of effluent insecurity. All the targeted EDCs in secondary effluent were totally degraded by TiO₂ photocatalysis within 60 min except BPA (92% removal), following pseudo first-order kinetics. The estrogenic activity was also totally removed: when EDCs reacted with hydroxyl radicals, aromatic rings were cleaved, resulting in a decreased estrogenic activity. Their findings suggested that TiO₂ photocatalysis is an effective method for the removal of certain EDCs and estrogenic activity from secondary effluents and can be used for advanced wastewater treatment.

Although photocatalysis by TiO₂ was thought to be an effective method for the degradation of organics, some researchers were concerned about the practicality of the process related to the relative difficulty of separating the catalyst powders and/or crystals from solution at the end of treatment (Gültekin and Ince, 2007). Different combined treatments have also been proposed. Ike *et al.* (2002) reported that the effectiveness of ozonation and ultraviolet photocatalytic treatment in the degradation of NPEO metabolites, using lab-scale reactors, follows the order: nonylphenoxy carboxylic acid >> NP > nonylphenol monoethoxylate. The degradation rate of NP by UV/TiO₂ was the highest among the metabolites tested, while NP1EO showed the lowest degradation rate. Acidic metabolites were completely degraded within 4-6 min (initial concentration 0.4-1 mg L⁻¹), the NP

concentrations were reduced by 75-80% in 6 min, while only 25-50% of NP1EO was eliminated at the same time. NP was efficiently degraded by ozonation, however, it was much less effective for NP1EO decomposition.

Balabanic *et al.* (2012) evaluated the treatment performance of different wastewater treatment procedures (biological treatment, filtration, AOPs) for the reduction of COD and seven EDCs including NP from pulp and paper wastewaters. Two pilot plants were running in parallel and the following treatments were compared: (i) anaerobic biological treatment followed by aerobic biological treatment, UF and RO, and (ii) anaerobic biological treatment followed by MBR and RO. Moreover, at the lab-scale, four different AOPs (Fenton reaction, photo-Fenton reaction, photocatalysis with TiO₂, and ozonation) were applied. The authors showed that the concentrations of the EDCs studied in paper mill wastewaters were effectively reduced (100%) by both combinations of pilot plants and photo-Fenton oxidation (98%), while Fenton process, photocatalysis with TiO₂ and ozonation were less effective (70% to 90%, respectively).

UV irradiation (photolysis) is a common practice for drinking water treatment. Photolysis has been one of the most widely investigated AOPs of EDC degradation. Ahel *et al.* (1994b) previously studied the sunlight photolysis of NP and NPEOs in natural waters. The photochemical oxidation of NPEO was shown to be significantly slower than that of NP. The photochemical degradation of both NP and NPEOs was due mainly to sensitized photolysis whilst direct photolysis was comparatively slow. Moreover, experiments with D₂O revealed that singlet

oxygen was not an important photooxidant of NP at pH values usually found in natural waters.

Neamtu *et al.* (2006) investigated the photolysis of NP using a solar simulator in the presence/absence of dissolved organic matter (DOM), HCO_3^- , NO_3^- and Fe(III) ions. The effects of different parameters such as initial pH, initial substrate concentration, temperature, and the effect of hydrogen peroxide concentration on photodegradation of nonylphenol in aqueous solution were assessed. The results indicated that the oxidation rate increased in the presence of H_2O_2 , Fe(III) and DOM with dissolved organic carbon concentrations not higher than 3 mg L^{-1} . Phenol, 1,4-dihydroxybenzene and 1,4-benzoquinone were identified using an HPLC method as intermediate products of NP photodegradation. Their results also showed a strong decrease of estrogenic activity of NP after 80 h of irradiation in the presence of hydrogen peroxide. The photolysis of NPEOs with an average oligomer length of ten ethoxylate units in aqueous solutions was also studied by Chen *et al.* (2007). The results showed that the degradation was effective but that the degradation pathway was complex. NPEOs with longer ethoxylate chains were degraded more easily than those with shorter chains. The performance was reduced in the presence of humic acid.

The application of sonochemistry, namely, the physical and chemical effects induced by ultrasonic irradiation in water, was also reported for the elimination of hazardous or toxic environmental contaminants in aqueous solutions. The reaction pathways proposed for the sonolytic degradation of organic compounds are the reaction with hydroxyl radicals (*e.g.*, hydroxyl radical attack and/or addition) and a thermal reaction (*e.g.*, pyrolysis). The

hydroxyl radicals are produced by the sonolysis of water molecules inside the collapsing cavitation bubble under extremely high temperature and pressure. The behaviour of the hydroxyl radicals generated may either involve reaction with organic compounds or recombination to form hydrogen peroxide (H_2O_2) inside the cavitation bubble and at its interfacial region. Pyrolysis of volatile organic compounds occurs inside the cavitation bubble or at the interfacial region, where the temperature is sufficiently high for the induction of thermal effects.

Yim *et al.* (2003) investigated the sonolysis of APs in aqueous solution under a variety of conditions. In particular, the effects of added Fe(II) and Fe(III) during the sonolytic degradation of NP in aqueous solution was explored with a particular focus on degradation enhancement. Their results showed that the sonolytic degradation rate of the APs depended upon their alkyl chain length. Free radicals played a significant role in the sonolytic degradation of APs. The sonochemical effects on addition of Fe(II) and Fe(III) as catalysts during sonication resulted in a remarkable enhancement of degradation and mineralization.

Ince and co-workers (Gültekin *et al.*, 2009; Ince *et al.* 2009) also proposed sonochemistry for NP degradation. High frequency irradiation (20 kHz ultrasound) permitted the efficient decomposition of 4-n-NP from water in alkalized conditions. The rate of reaction increased with increasing concentrations of the substance up to a critical value above which it declined and stabilized (Ince *et al.* 2009). The impact of pH was such that the rate of degradation was maximum at pH=10.8, minimum at pH=3.0 and in between the two extremes at pH=6.0 (Gültekin *et al.*,

2009). The extreme rapidness of the reaction in alkaline conditions was related to the pKa of NP (10.7) and the facilitation of the covalent bond cleavage between the phenolic and alkyl groups. The fact that the reaction was faster at more acidic pH than at pH 6 was attributed to the protonation of the molecule enhancing its migration towards the negatively charged gas bubbles. The reaction rate was also accelerated by bubbling the solution with oxygen gas and by the addition of Fenton and Fenton-like reagents. The enhancement by the latter stresses the role of OH radicals in the overall degradation process. The efficiency of sono-Fenton reactions was significantly improved by the addition of a sufficient dose of H₂O₂ into the reactor.

3.2.5.5 Removal of APs by other water and wastewater treatment methods

Wada *et al.* (1995) reported APS elimination by the formation of water-insoluble precipitates through the reaction of quinine derivatives enzymatically generated from APs with amino group-containing polymers (chitosan, polyethyleneimine) in solution. Jones and Westmoreland (1998, 1999) treated nonylphenol ethoxylate residues from wool scour effluents by flocculation using a specific flocculant, and reported uptake >95%. The process transferred the pollutants from the wastewater stream to a spadeable sludge that was used as a starting material to produce high quality compost. During the composting process, the detergents were degraded to below detectable levels.

Ciorba *et al.* (2002) investigated the behaviour of aluminium and carbon steel electrodes in the presence and absence of NPEO and NPEO removal by electrochemically-generated coagulants. The

electrode processes were studied by potentiodynamic polarization measurements to determine the influence of surfactant addition (ethylene oxide units and organic load), inorganic composition and pH. The polarization curves showed the extent of the involvement of NPEO in the electrode processes. Their influence appeared clearly in the range of anodic activation, depending on the number of ethoxylate groups. Removal of NPEO from simulated wastewaters was carried out in electrocoagulation cells with vertical or horizontal electrodes. The removal efficiencies calculated from the COD before and after treatment were 30-50% for NP16EO and NP40EO, and 40-80% for NP4EO. The hydrophilic-lipophilic balance number for NP4EO indicated a relative ratio of polar and non-polar groups lower than for the other two surfactants, which was in favour of better NP4EO removal. The experiments showed that bulk processes (bridging of electrochemically-generated polymeric species and adsorption of surfactants) were predominant over the involvement of NPEO in the electrode processes, which were only responsible for the electrogeneration of coagulants.

3.2.6 Concluding and personal remarks

Alkylphenols are used to synthesise polyethoxylated derivatives, mainly nonylphenol polyethoxylates and octylphenol polyethoxylates, essential in numerous applications. For instance, technical grade nonylphenol is produced on a large scale from phenol for the synthesis of alkylphenol polyethoxylates, a large family of nonionic surfactants often used in domestic detergents, dispersing agents, and industrial and institutional cleaners. These compounds are found in the various

environmental compartments as a result of their wide use and this presence in the environment is entirely due to human activity. These molecules can find their way directly into the environment, for instance through industrial effluent, or they can transit via municipal sewage treatment plants. Effluent from treatment plants is in fact considered to be the largest source of NPs in the environment (Soares *et al.*, 2008; Sabik *et al.*, 2003; Giger *et al.*, 1984). Numerous articles report the contamination of the various compartments of the environment: water, soil, sediment, atmosphere (Table III.17). Although legislation concerning the use of APs and their derivatives has become increasingly strict over recent years, in *e.g.* the EU, Switzerland and Canada, these molecules are still found in the environment, especially in the aquatic environment.

Many studies have also focused on methods, mostly at the laboratory scale, for the elimination of APs. However, little is known about the efficiency of these techniques for the removal of APs and their derivatives when applied to actual domestic and industrial effluent. It can be noted that the existing conventional water and wastewater treatment plants were not designed for these new contaminants and also that no appropriate methods have been developed to deal with them at the industrial or urban scale. In addition, the removal success of APs can vary greatly from one treatment plant to the next. A non-negligible part of the AP and their derivatives entering the plant thus finds its way to the outlet and on into the environment without having been degraded. The few studies published on the subject show that the best levels of degradation are achieved with plants using the most complete treatment processes, involving treatment with ozone, active carbon, or

both) (Berryman *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007; Soares *et al.* 2008). A treatment process composed of ozonation and subsequent activated carbon filtration with chlorination was able to remove 95% of NP (Soares *et al.* 2008). Likewise, very few data are available on the treatment of industrial effluent (Berryman *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007). The small number of studies tends to support the widespread trend to look for substitutes for these products, particularly in Europe, in the framework of the REACH program which concerns the regulation of chemicals and their safe use.

As already mentioned, sewage treatment plants do eliminate part of these substances, mainly through degradation processes occurring in the activated sludge. The mechanisms involved in the degradation have been clarified for a number of years. Elimination by adsorption to the sludge is a removal mechanism that is enhanced with the time spent in the sewage treatment plants, the type of treatment and the temperature (Soares *et al.*, 2008; Maguire, 1999). Degradation is then only partial and occurs through dissociation of each of the ethoxylated moieties. An aerobic sequence during the treatment of the waste water produces carboxylated NPs while an anaerobic sequence generates the ethoxylated counterparts (Mayer *et al.*, 2007). The endpoint of the degradation of nonylphenol ethoxylates is nonylphenol itself (Corvini *et al.*, 2006; Ying *et al.*, 2002; Bennie, 1999; Servos, 1999).

The question remains as to the method or combination of methods best suited for the efficient treatment of these molecules often present as traces in complex industrial effluent or urban wastewater. Several types of treatment involving physical, biological or chemical processes have been proposed

following laboratory studies and can be envisaged at the urban/industrial scale (Table III.21). A certain number of problems must be born in mind: i) the ability to treat complex effluent, especially industrial waste of highly diverse origins, ii) heterogeneous pollution outflow – not only variable concentrations but also variable types of pollutants with different levels of toxicity – iii) and of course rapidly changing volumes of effluent to process. Taking into account each of these characteristics, four methods are often quoted for the treatment of an effluent presenting different contaminations – including APs – namely adsorption on active charcoal, membrane filtration, biotechnology and advanced techniques of oxidation.

Active-carbon technology in adsorption-oriented processes could be a valid solution owing to its simplicity and chemical efficiency. Activated carbons are known for being very broad spectrum adsorbents, able to remove not only metals, dyes and pesticides, but also novel organic molecules such as endocrine disrupting compounds (Paune *et al.*, 1998). Another major advantage of treating water with activated

carbon is that no by-products are formed, unlike chemical treatment or chemical oxidation. In addition, microporous carbons can be used as supports for bacteria which degrade part of the adsorbed organic material (biological elimination) and thus operate *in situ* regeneration of the adsorbent. However, although the high absorbing power of activated carbon no longer needs to be proved, it does pose the problem of elimination after use, especially since it becomes rapidly saturated: the efficiency of the filters decreases with time. They must then be changed or regenerated. Regeneration is carried out with heat or chemicals and is rather costly in energy, leading to real economic issues. An alternative solution is to use the so-called non-conventional carbons, *i.e.* carbons obtained from low-cost resources such as agricultural bagasse, husks, *etc.*, which are simply incinerated as soon as they become saturated. AP adsorption onto non-conventional adsorbents (cyclodextrins, biopolymers, biomass, *etc.*) has also been proposed with interesting results although these processes are basically at the stage of lab scale.

Table III.21. A brief summary of advantages, disadvantages and remarks concerning the main methods for AP removal from water and wastewater.

Process	Main characteristic	Advantages / Disadvantages / Remarks
Adsorption : active carbons, non-conventional materials	non-destructive process	efficient treatment with COD and TOC reduction excellent quality of the treated solution/effluent ; rapid saturation of the reactors elimination of the adsorbent combined with a biological step, adsorption may be an interesting process for water and wastewater treatment applications
Biological: biodegradation, membrane bioreactor, activated sludge process, biotechnology	use of biological cultures and/or membranes	well accepted by the public as 'natural' degradation efficient treatment ; management and maintenance of the microorganisms biotechnology through the use of different types of microorganisms and biocatalysts is an economical approach compared to other techniques and an ecologically favourable process mainly for water treatment applications
Oxidation : photocatalysis, photolysis	in situ production of reactive hydroxyl radicals	efficient emerging process: lab-scale mineralization of the APs with COD and TOC reduction interesting results with TiO ₂ -photocatalytic processes no or few chemicals added ; no production of sludge economically non-viable (WWTPs) ; possible formation of byproducts potential water reuse applications (photocatalysis); photocatalysis may be envisaged in an integrated approach mainly for wastewater treatment applications
Ozonation	use of an oxidant	efficient process generation of ozone on-site; possible formation of intermediates increased biodegradability of the effluent ; disinfection high energy requirements for water and wastewater treatment applications
Membrane filtration : NF, RO	non-destructive process	rapid and efficient, and no chemicals required high investment and energy costs problematic: membrane clogging, elimination of the concentrate mainly for water treatment applications

As a result of the development of recycling and reutilisation policies, membranes, which were originally devoted to the production of drinking water, are now progressively gaining ground in the treatment of industrial effluent. This type of technology enables the separation not only of colloidal particles, but also of dissolved substances. Membrane filtration (NF, RO, *etc.*) provides high quality abatement of APs but its main disadvantage is its relatively high cost. Membrane bioreactor systems are considered to be among the most promising technologies in microbiological wastewater treatment for the removal of emerging compounds from urban wastewaters (Cases *et al.*, 2011). Much work is also necessary to demonstrate the possibilities of membrane bioreactors for industrial wastewater treatment. Biotechnological processes based on the use of (immobilized) microorganisms could also represent an effective alternative to conventional treatments.

Another solution, which presents advantages from the point of view of chemical efficiency, is the technique of advanced oxidation. The aim of this process is to modify the state of novel refractory toxic organic molecules, particularly by biodegradation, i) to render them insoluble for elimination by precipitation, ii) to transform them to yield new substances that are soluble but not or less toxic, iii) to eliminate them completely by mineralization. Advanced oxidation processes are very efficient for the treatment of effluent containing refractory compounds that are toxic and/or non-biodegradable and are reported to give excellent results in particular in COD and TOC reduction due to mineralization of organic compounds. Based on a substantial number of relevant

studies, photocatalysis, among the wide variety of AOPs, is an interesting tool for AP treatment due to its potential to render mineralization complete. In association with biodegradation or adsorption, advanced oxidation would appear to be the technique of the future, although its cost is still preventing its generalization. Gültekin and Ince (2007) reported that the main advantage of AOPs over all chemical and biological treatments was their environmental friendliness as they neither transfer pollution from one phase to the other as in chemical insolubilisation and adsorption nor produce large amounts of hazardous sludge as in ASP. However, despite these advantages, AOPs can also lead to the formation of harmful by-products in the effluent. A list of identified oxidation by-products can be found in a review by Gültekin and Ince (2007), where phenol and p-hydroquinone were the most commonly observed molecules regardless of the AOP technique. In general, research has mainly focused on the technical performances of AOPs, while their environmental impact is usually ignored. On this point, Belgiorno *et al.* (2007) reported that, the effluent produced by various AOPs though not toxic itself, might after final disinfection be transformed into toxic compounds. Rizzo (2011), reviewing recent developments in bioassays used as a tool to quantify AOPs in water and wastewater treatment effluent, comprehensively discussed the effects of AOPs on the toxicity of aqueous solutions of different classes of contaminants such as endocrine disrupting compounds and the toxicity-biodegradability dualism that occurs when AOPs are used in a pretreatment step to improve industrial wastewater biodegradability. Rizzo (2011) concluded

that bioassays were extremely useful tools to evaluate the dangerousness of AOPs.

In WWTPs, several studies have shown that removal of NP from wastewater can be enhanced by adding activated carbon filters, UV treatment and ozonation to existing treatment processes (Paune *et al.*, 1998; Johnson and Sumpter, 2001; Tanghe and Verstraete, 2001). AOPs and membrane-based technologies are also an option to treat urban sewage. These methods are efficient from a chemical point of view and could complete the currently used sequences of treatment (Johnson and Sumpter, 2001). However, many are not exploitable for technological but especially economic reasons. Between 2005 and 2010, the United Kingdom conducted a demonstration program to evaluate technologies to remove endocrine disrupting compounds from urban wastewater (Jones *et al.*, 2007). Advanced treatment techniques undoubtedly reduce the discharge of micropollutants, however, they inevitably exacerbate costs, and entail environmentally undesirable increases in energy consumption and CO₂ emission. In addition, the costs involved may only be justifiable in the event of waste water recycling (as in agro-food or pharmaceutical industries) or to make water suitable for consumption, where the aim is not to reduce pollution of the natural environment but to preserve the food chain from contamination or to preserve particularly vulnerable aquatic systems such as lakes. Moreover, except for oxidation techniques, the elimination of APs implies their transfer into the sludge, and once there, very little is known of their fate although some recent studies do tend to show that composting of the sludge is an efficient means of attenuating the levels of nonylphenols. For instance, these methods do not resolve one of the main problems which is their accumulation in the sludge due to the high

hydrophobicity of APs. Most of the sludge disposal routes including recycling to land, disposal in landfill, biological stabilization and incineration have drawbacks such as high costs and contamination of the environment. Alternative methods for treating NP contaminated sludge have been proposed such as composting (La Guardia *et al.*, 2001) and aerobic stabilization (Giger *et al.*, 1984).

Finally our literature survey showed that research has been and continues to be conducted in the areas of combined oxidation-adsorption, oxidation-biodegradation or adsorption-biological treatments in order to improve the removal, degradation and/or biodegradation of APs (Oller *et al.*, 2011). Combined methods are interesting because they take advantage of synergistic effects. However, the large majority of the works published focus on the behaviour of a single chemical tested in much higher concentrations than those detected in the water environment, whereas APs exist in complex mixtures rather than as a single product. Future research needs to look into this aspect.

Now what remains to be done is to find novel solutions for the elimination of APs – not only from water but also from real wastewaters – that are chemically efficient, technically feasible, economically viable, and ecologically friendly. To achieve this aim, it will be necessary to adopt a multidisciplinary approach with chemists, biologists, microbiologists, polymerists and engineers working together towards a common goal.

Acknowledgements

The authors thank the *Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée & Corse*, the *FEDER-Fonds Européen de Développement Régional*, and the *Région of Franche-Comté* for financial support (NIRHOFEX Program “Emerging compounds in

industrial effluents”) and the *Ville de Besançon*, which provided financial support for the Ph.D. student A. Priac.

3.2.7 References

- Abe, I., 1999. Adsorption properties of endocrine disruptors onto activated carbon. *J. Water Waste.* 41, 43-47.
- Agenson, K.O., Oh, J.I., Urase, I., 2003. Retention of a wide variety of organic pollutants by different nanofiltration/reverse osmosis membrane controlling parameters of process. *J. Membrane Sci.* 225, 91-103.
- Ahel, M., Giger, W., 1985. Determination of alkylphenols and alkylphenol mono and diethoxylates in environmental samples by high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 57, 1577-1583.
- Ahel, M., Giger, W., 1993. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* 26, 1461-1470.
- Ahel, M., McEvoy, J., Giger, W., 1993. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Poll.* 79, 243-248.
- Ahel, M., Giger, W., Koch, M. 1994a. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28, 1131-1142.
- Ahel, M., Scully, F.E., Hoigne, J., Giger, W., 1994b. Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenolpolyethoxylates in natural-waters. *Chemosphere* 28, 1361-1368.
- Aoki, N., Nishikawa, M., Hattori, K., 2003. Synthesis of chitosan derivatives bearing cyclodextrin and adsorption of p-nonylphenol and bisphenol A. *Carbohydr. Polym.* 52, 219-223.
- Aoki, N., Kinoshita, K., Arai, R., Mikuni, K., Nakanishi, K., Hattori, K., 2004. Preparation of insoluble chitosan beads functionalized by carboxymethylated beta-cyclodextrin. *Trans. Mat. Res. Soc. Japan* 30, 1143-1146.
- Argese, E., Marcomini, A., Bettiol, C., Perrin G., Miana, P., 1994. Submitochondrial particle response to linear alkylbenzene sulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their biodegradation derivatives. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 737-742.
- Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A., 2012. Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Toxicol. Lett.* 210, 141-154.
- Baig, S., Hansmann, G., Paolini, B., 2008. Ozone oxidation of oestrogenic active substances in wastewater and drinking water. *Water Sci. Technol.* 58, 451-458.
- Balanic, D., Hermosilla, D., Merayo, N., Klemencic, A.K., Blanco, A., 2012. Comparison of different wastewater treatment for removal of selected endocrine-disruptors from paper mill wastewaters. *J. Environ. Sci. Health part A: Toxic/Hazardous Substances & Environ. Eng.* 47, 1350-1363.
- Baldwin, W.S., Graham, S.E., Shea D., LeBlanc, G.A., 1997. Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1905-1911.
- Barhoumi, M., Beurroies, I., Denoyel, R., Saïd, H., Hanna, K., 2003. Coadsorption of alkylphenols and nonionic surfactants onto kalonite. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 219, 25-33.
- Bärlocher, F., Guenzel, K., Sridhar, K.R., Duffy, S.J., 2011. Effects of 4-n-nonylphenol on aquatic hyphomycetes. *Sci. Total Environ.* 409, 1651-1657.
- Basile, T., Petrella, A., Petrella, M., Boghetich, G., Petruzzelli, V., Colasuonno, S., Petruzzelli, D., 2011. Review of Endocrine-Disrupting-Compound Removal Technologies in Water and Wastewater Treatment Plants: An EU Perspective. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 8389-8401.
- Belgiorio, V., Rizzo, L., Fatta, D., Della Rocca, C., Lofrano, G., Nikolaou, A., Naddeo V., Meric S., 2007. Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination* 215, 166-176.
- Bennie, D.T., 1999. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol

- ethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada* 34, 79-122.
- Bergé, A., Cladière M., Gasperi, J., Coursimault A., Tassin, B., Moilleron, R., 2012. Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenol. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3798-3819.
- Berryman, D., Houde, F., DeBlois, C., O'Shea, M., 2004. Nonylphenolic compounds in drinking water and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: A survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. *Chemosphere* 56, 247-255.
- Bertanza, G., Pedrazzani, R., Papa, M., Mazzoleni, G., Steimberg, N., Caimi, L., Montani, C., Dilorenzo, D., 2010a. Removal of BPA and NpNEOs from secondary effluents of municipal WWTPs by means of ozonation. *Chemosphere* 32, 204-208.
- Bertanza, G., Pedrazzani, R., Zambarda, V., Dal Grande, M., Icarelli, F., Baldassarre, L., 2010b. Removal of endocrine disrupting compounds from wastewater treatment plant effluents by means of advanced oxidation. *Water Sci. Technol.* 61, 1663-1671.
- Bertin, L., Di Gioia, D., Barberio, C., Salvadori, L., Marchetti, L., Fava, F., 2007. Biodegradation of polyethoxylated nonylphenols in packed-bed biofilm reactors. *Eng. Chem. Res.* 46, 6681-6687.
- Bester, K., Theobald, N., Schroder, H.F., 2001. Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis(4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere* 45, 817-826.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239, 229-246.
- Bonenfant, D., Niquette, P., Mimeault, M., Furtos-Matei, A., Hausler, R., 2009. UV-Vis and FTIR spectroscopic analyses of inclusion complexes of nonylphenol and nonylphenol ethoxylate with β -cyclodextrin. *Water Res.* 43, 3575-3581.
- Bonenfant, D., Niquette, P., Mimeault, M., Hausler, R., 2010. Adsorption and recovery of nonylphenol ethoxylate on a crosslinked β -cyclodextrin-carboxymethylcellulose polymer. *Water Sci. Technol.* 61, 2293-2301.
- Bouki, C., Dvorakova, M., Diamadopoulous, E., 2010. Adsorption of nonylphenol on activated sludge biomass under aseptic conditions. *Clean Soil Air Water* 38, 516-520.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A., Sumpter, J.P., 2005. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ. Health Perspectives* 113, 721-728.
- Brooke, L. Thursby, G., 2005. Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol. Report for the United States EPA; Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- Cabana, H., Jones, J.P., Agathos, S.N., 2007a. Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: A review. *Eng. Life Sci.* 7, 429-456.
- Cabana, H., Jones, J.P., Agathos, S.N., 2007b. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *J. Biotechnol.* 132, 23-31.
- Cabana, H., Habib Jiwan, J.L., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M.J., Agathos, S.N., Jones, J.P., 2007c. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Corioloropsis polyzona*. *Chemosphere* 67, 770-778.
- Cabana, H., Alexandre, C., Agathos, S.N., Jones, J. P., 2009. Immobilization of laccase from the white rot fungus *Corioloropsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. *Bioresour. Technol.* 100, 3447-345.
- Camacho-Munoz, D., Martin, J., Santos, J.L., Alonso, E., Aparicio, I., De la Torre, T., Rodriguez, C., Malfeito, J.J., 2012. Effectiveness of three configurations of membrane bioreactors on the removal of

- priority and emergent organic compounds from wastewater: comparison with conventional wastewater treatments. *J. Environ. Monitoring* 14, 1428-1436.
- Cases, V., Argandona, A.V, Rodriguez, M., Prats, D., 2011. Endocrine disrupting compounds: A comparison of removal between conventional activated sludge and membrane reactors. *Desalination* 272, 240-245.
- Castillo, M., Penuela, G., Barcelo, D., 2001. Identification of photocatalytic degradation products of non-ionic polyethoxylated surfactants in wastewaters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometric detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369, 620-628.
- Chen, L., Zhou, H.Y., Deng, Q.Y., 2007. Photolysis of nonylphenol ethoxylates: The determination of the degradation kinetics and the intermediate products. *Chemosphere* 68, 354-359.
- Chen, H.W., Liang, C.H., Wu, Z.M., Chang, E.E., Lin, T.F., Chiang, P.C. Wang, G.S., 2013. Occurrence and assessment of treatment efficiency of nonylphenol, octylphenol and bisphenol-A in drinking water in Taiwan. *Sci. Total Environ.* 449, 20-28.
- Choi, K.J., Kim, S.G., Kim, C.W., Kim, S.H., 2005. Effects of activated carbon types and service life on removal of endocrine disrupting chemicals: amitrol, nonylphenol and bisphenol A. *Chemosphere* 58, 1535-1545.
- Cicek, N., 2003. A review of membrane bioreactors and their potential application in the treatment of agricultural wastewater. *Canadian Biosystems Eng.* 45, 37-49.
- Ciorba, G.A., Radovan, C., Vlaicu, I., Masu, S., 2002. Removal of nonylphenol ethoxylates by electrochemically-generated coagulants. *J. Appl. Electrochem.* 32, 561-567.
- Clarke, B.O., Smith, S.R., 2011. Review of emerging organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.* 37, 226-247.
- Comber, M.H.I., Williams, T.D., Stewart, K.M., 1993. The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Water Res.* 27, 273-276.
- Corsi, S.R., Zitomer, D.H., Field, J.A., Cancilla, D.A., 2003. Nonylphenol ethoxylates and other additives in aircraft de-icers, anti-icers, and waters receiving airport runoff. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4031-4037.
- Corvini, P.F.X., Schaffer, A., Schlosser D., 2006. Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols: our evolving view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 223-243.
- Crini, G., Badot, P.M., 2007. Traitement et épuration des eaux industrielles (in French). Ed.: PUFC, Besançon, France, 356 p.
- Crini, G., Badot, P.M., 2008. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Prog. Polym. Sci.* 33, 399-447.
- David, A., Fenet, H., Gomez, E., 2009. Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations. *Marine Poll. Bull.* 58, 953-960.
- De la Fuente, L., Acosta, T., Babay, P., Curutchet, G., Candal, R., Litter, M., 2010. Degradation of nonylphenol ethoxylate-9 (NPE-9) by photochemical advanced oxidation technologies. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 6909-6915.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *Int. J. Hygiene Environ. Health* 214, 442-448.
- Di Gioia, Fambrini, L., Coppini, E., Fava, F., Barberio, C., 2004. Aggregation-based cooperation during bacterial aerobic degradation of polyethoxylated nonylphenols. *Res. Microbiol.* 155, 761-749.
- Di Gioia, D., Salvadori, L., Zanaroli, G., Coppini, E., Fava, F., 2008. Characterization of 4-nonylphenol-degrading bacterial consortium obtained from a textile wastewater pre-treatment plant. *Arch. Microbiol.* 190, 673-683.
- Di Gioia, D., Sciubba, L., Bertin, L., Barberio, C., Salvadori, L., Frassinetti, S., Fava, F., 2009. Nonylphenol polyethoxylate degradation in aqueous waste by the use of batch and

- continuous biofilm bioreactors. *Water Res.* 43, 2977-2988.
- Directive 2000/60/EC, 2000. Establishment and framework for community action in the field of water policy. Luxembourg. European Parliament and the Council of the European Union.
- Directive 2003/53/EC, 2003. Amending for the 26th time the Council directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and cement). Luxembourg. European Parliament and the Council of the European Union.
- Espantaleon, A.G., Nieto, J.A., Fernandez, M., Marsal, A., 2003. Use of activated clays in the removal of dyes and surfactants from tannery waste waters. *Appl. Clay Sci.* 24, 105-110.
- Fan, J., Yang, W.B., Li, A.M., 2011. Adsorption of phenol, bisphenol A and nonylphenol ethoxylates onto hypercrosslinked and aminated adsorbents. *React. Funct. Polym.* 71, 994-1000.
- Fan, J., Yang, W.B., Li, A.M., 2012. Surface and Lateral Interactions of Nonylphenol Nonionic Surfactants with Porous Resin. *Sep. Sci. Technol.* 47,494-501.
- Field, J.A., Johnson, C.A., Rose, J.B., 2006. What is "emerging"? *Environ. Sci. Technol.* 40, 7105-7105.
- Frassinetti, S., Barberio, C., Caltavuturo, L., Fava, F., Di Gioia, D., 2011. Genotoxicity of 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate mixtures by the use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 mutation assay and use of this text to evaluate the efficiency of biodegradation treatments. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 74, 253-258.
- Fujii, K., Yamamoto, R., Tanaka, K., Hirakawa, T., Kikuchi, S., 2003. Potential of a new biotreatment: *Sphingomonas cloacae* S-3T degrades nonylphenol in industrial wastewater. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 531-535.
- Gallenkemper, M., Wintgens, T., Melin, T., 2003. Nanofiltration of endocrine disrupting compounds. *Membranes in Drinking and Industrial Water Production* 321-327.
- Gao, Q.T., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2011a. Removal and biodegradation of nonylphenol by different *Chlorella* species. *Marine Poll. Bull.* 63, 445-451.
- Gao, Q.T., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2011b. Removal and biodegradation of nonylphenol by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 102, 10230-10238.
- Giger, W., Brunner, P.H., Schaffner, C., 1984. 4-nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225, 623-625.
- Gonzalez, S., Lopez-Roldan, R., Cortina, J.L., 2012. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A review. *Environ. Poll.* 161, 83-92.
- Guenther, K., Kleist, E., Thiele, B., 2006. Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: A systematic numbering system and future trends. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 542-546.
- Gültekin, I., Ince, N.H., 2007. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. *J. Environ. Manag.* 85, 816-832.
- Gültekin, I., Tezcanli-Guyer, G., Ince, N.H., 2009. Degradation of 4-n-nonylphenol in Water by 20 kHz Ultrasound. *J. Adv. Oxidation Technol.* 12, 105-110.
- Hager, C.D., 1998. Alkylphenol ethoxylates – biodegradability, aquatic toxicity and environmental activity. In: Karsa, D.R., ed. *Annual surfactant review*. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press.
- Hyunook, K., Guisu, P., Myongjin, Y., Eunjung, K., Youngkook, H., Colosimo, M., 2007. Oxidation of nonylphenol in water using O₃. *Res. J. Chem. Environ.* 11, 7-12.
- Ike, M., Asano, M., Belkada, F.D., Tsunoi, S., Tanaka, M., Fujita, M., 2002. Degradation of biotransformation products of nonylphenol ethoxylates by ozonation and UV/TiO₂ treatment. *Water Sci. Technol.* 46, 127-132.
- Ince, N.H., Gültekin, I., Tezcanli-Güyer, G., 2009. Sonochemical destruction of nonylphenol: Effects of pH and hydroxyl radical scavengers. *J. Hazard. Mat.* 172, 739-743.

- Inumaru, K., Kiyoto, J., & Yamanaka, S., 2000. Molecular selective adsorption of nonylphenol in aqueous solution by organo-functionalized mesoporous silica. *Chem. Comm.* 11, 903-904.
- Ishibashi, H., Hirano, M., Matsumura, N., Watanabe, N., Takao, Y., Arizono, K., 2006. Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 65, 1019-1026.
- Iwasaki, S., Fukuhara, T., Abe, I., Yanagi, J., Mouri, M., Iwashima, Y., Tabuchi, T., Shinohara, O., 2002. Adsorption of alkylphenols onto microporous carbons prepared from coconut shell. *Synthetic Metals* 125, 207-211.
- Jackson, J., Sutton, R., 2011. Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. *Sci. Total Environ.* 405, 153-160.
- Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4697-4703.
- Johnson, A.C., Aerni, H.R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jurgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M.J.F., Svenson, A., Wettstein, F.E., 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res.* 39, 47-58.
- Jones, F.W., Westmoreland, D.J., 1998. Degradation of nonylphenol ethoxylates during the composting of sludges from wool scour effluent. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2623-2627.
- Jones, F.W., Westmoreland, D.J., 1999. Removal of wool wax, nonylphenol ethoxylates and pesticide residues from wool scour effluent. *Water Res.* 33, 1775-1780.
- Jones, O.A.H., Green, P.G., Vouvolis, N., Lester, J.N., 2007. Questioning the excessive use of advanced treatment to remove organic micropollutants from wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5085-5089.
- Jung, Y.J., Kiso, Y., Park, H.J., Nishioka, K., Min, K.S., 2007. Rejection properties of NF membranes for alkylphenols. *Desalination* 202, 278-285.
- Kelessidis, A., Stasinakis, A.S., 2012. Comparative study of the methods used for the treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Manage.* 32, 1186-1195.
- Kim, Y.S., Katase, T., Sekine, S., Inoue, T., Makno, M., Uchiyama, T., Fujimoto, Y., Yamashita, N., 2004. Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* 54, 1127-1134.
- Kim, J., Korshin, G.V., Velichenko, A.B., 2005. Comparative study of electrochemical degradation and ozonation of nonylphenol. *Water Res.* 39, 2527-2534.
- Kiso, Y., Kon, T., Kitao, T., Nishimura, K., 2000. Rejection properties of alkyl phthalates with nanofiltration membranes. *J. Membrane Sci.* 182, 205-214.
- Kurinobu, S., Tsurusaki, K., Natui, Y., Kimata, M., Hasegawa, M., 2007. Decomposition of pollutants in wastewater using magnetic photocatalyst particles. *J. Magnetism Magnetic Mat.* 310, E1025-E1027.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E.P., Mainor, T.M., 2001. Alkylphenol ethoxylate degradation products in land-applied sewage sludge (biosolids). *Environ. Sci. Technol.* 35, 4798-4804.
- Lang, W., Dejma, C., Sirisansaneeyakul, S., Sakairi, N., 2009. Biosorption of nonylphenol on dead biomass of *Rhizopus arrhizus* encapsulated in chitosan beads. *Bioresour. Technol.* 100, 5616-5623.
- Langford, K.H., Lester, J.N., 2002. Fate and behavior of endocrine disrupters in wastewater treatment processes. In: Brikett, J.W. and Lester, J.N., eds. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. Boca Raton, USA: CRC Press Inc.
- Lee, H.B., 1999. Review of analytical methods for the determination on nonylphenol and related compounds in environmental samples. *Water Qual. Res. J. Canada* 34, 3-35.
- Li, D., Kim, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Oh, J.R., Kwon, Y.S., 2004. Seasonal flux of nonylphenol in Han River, Korea. *Chemosphere* 56, 1-6.

- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Hong, S.H., Oh, J.R., Yim, U.H., Jeung, J.H., Kanan, N., Kim, E.S., Cho, S.R., 2005. Seasonal and spatial distribution of nonylphenol and IBP in Saemangeum Bay, Korea. *Marine Poll. Bull.* 51, 966-974.
- Li, H.Q., Jiku, F., Schroder, H.F., 2000. Assessment of the pollutant elimination efficiency by gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and –tandem mass spectrometry – Comparison of conventional and membrane-assisted biological wastewater treatment processes. *J. Chromatogr.* 889, 155-176.
- Liu, Y., Tam, N.F.Y., Guan, Y., Yasojima, M., Zhou, J., Gao, B., 2011. Acute toxicity of nonylphenol and bisphenol A to the embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicol.* 20, 1233-1245.
- Liu, Z.H., Kanjo, Y., Mizutami, S., 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment – physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Sci. Total Environ.* 407, 731-748.
- Lopez-Espinosa, Freire, M.J., Arrebola, J.P., Navea, N., Taoufiki, J., Fernandez, M.F., Ballesteros, O., Prada, R., Olea, N., 2009. Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere* 76, 847-852.
- Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jimenez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leiendecker, F., Ternes, T., Ortega, A.N., Hildebrandt, A., Barcelo, D., Lepom, P., Dimitrova, I., Nitcheva, O., Polesello, S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., de Boer R., Staeb, J., 2008. Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water. *Trends Anal. Chem.* 27, 89-95.
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. EU-wide survey of polar organic organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Poll.* 157, 561-568.
- Lozano, N., Rice, C.P., Pagano, J., Zintek, L., Barber, L.B., Murphy, E.W., Nettekheim, T., Minarik, T., Schoenfuss, H.L., 2012. Concentration of organic contaminants in fish and their biological effects in a wastewater-dominated urban stream. *Sci. Total Environ.* 420, 191-201.
- Lyko, S., Wintgens, T., Melin, T., 2005. Estrogenic trace contaminants in wastewater – possibilities of membrane bioreactor technology. *Desalination* 178, 95-105.
- Maguire, R.J., 1999. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Qual. Res. J. Canada* 34, 37-78.
- Mayer, T.D., Bennie, D., Rosa, F., Rekas, G., Palabrica, V., Schachtschneider, J., 2007. Occurrence of alkylphenolic substances in a Great Lakes coastal marsh, Cootes Paradise, ON, Canada. *Environ. Poll.* 147, 683-690.
- Morin-Crini, N., Crini, G., 2013. Environmental applications of water-insoluble- β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Prog. Polym. Sci.* 38, 344-368.
- Murai, S., Imajo, S., Maki, Y., Takahashi, K., Hattori, K., 1996. Adsorption and recovery of nonionic surfactants by β -cyclodextrin polymer. *J. Colloid Int. Sci.* 183, 118-123.
- Murai, S., Kinoshita, K., Ishii, S., Aoki, N., Hattori, K., 2006. Removal of phenolic compounds from aqueous solution by beta-cyclodextrin polymer. *Trans. Mat. Res. Soc. Japan* 32, 977-980.
- Murray, A., Örmeci, B., 2012. Application of molecularly imprinted and non-imprinted polymers for removal of emerging contaminants in water and wastewater treatment: a review. *Environ. Sci. Poll. Res.* 19, 3820-3830.
- Nagasaki, S., Nakagawa, Y., Tanaka, A., 2003. Sorption of nonylphenol on Namontmorillonite. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 230, 131-139.
- Naylor, C.G., Mieux, J.P., Adams, W.J., Weeks, J.A., Castaldi, F.J., Ogle, L.D., Romano, R.R., 1992. Alkylphenol ethoxylates in the environment. *J. Am. Oil Chemists Soc.* 69, 695-703.

- Neamtu, M., Frimmel, Fritz H., 2006. Photodegradation of endocrine disrupting chemical nonylphenol by simulated solar UV-irradiation. *Sci. Total Environ.* 369, 295-306.
- Nikolenko, N.V., Korpach, A.P., Masyuta, Z.V., 2002. Adsorption of ethoxylated alkylphenols on silica gel from aqueous micellar solutions. *Colloid J.* 64, 393-397.
- Nimrod, A.C., Benson, W.H., 1996. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit. Reviews Toxicol.* 26, 335-364.
- Ning, B., Graham, N.J.D., Zhang, Y., 2007a. Degradation of octylphenol and nonylphenol by ozone – Part I: Direct reaction. *Chemosphere* 68, 1163-1172.
- Ning, B., Graham, N.J.D., Zhang, Y., 2007b. Degradation of octylphenol and nonylphenol by ozone – Part II: Indirect reaction. *Chemosphere* 68, 1173-1179.
- Niu, H.H., Wang, Y.X., Zhang, X.L., Meng, Z.F., Cai, Y.Q., 2012. Easy synthesis of surface-tunable carbon-encapsulated magnetic nanoparticles: Adsorbents for selective isolation and preconcentration of organic pollutants. *ACS Appl. Mat. Interfaces* 4, 286-295.
- Oller, I., Malato, S., Sanchez-Pérez, J.A., 2011. Combination of advanced oxidation processes and biological for wastewater decontamination – A review. *Sci. Total Environ.* 409, 4141-4166.
- Oros, D.R., Jarman, W.M., Lowe, T., David, N., Davis, J.A., 2003. Surveillance for previously unmonitored organic contaminants in the San Francisco estuary. *Marine Poll. Bull.* 46, 1102-1110.
- Patureau, D., Delgenes, N., Delgenes, J.P., 2008. Impact of sewage sludge treatment processes on the removal of the endocrine disrupters nonylphenol ethoxylates. *Environ. Int.* 72, 586-591.
- Paune F., Caixach, J., Espadaler, I., Om, J., Rivera, J., 1998. Assessment on the removal of organic chemicals from raw and drinking water at a Llobregat river water works plant using GAC. *Water Res.* 32, 3313-3324.
- Peng, Z.G., Li, J., Feng, J.M., Wu, Z.C., Deng, N.S., 2012. The adsorption of nonylphenol by algae. *Fresenius Environ. Bull.* 21, 101-106.
- Petrovic, M., Sole, M., de Alda, M.J.L., Barcelo, D., 2002. Endocrine disruptors in sewage plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2146-2156.
- Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Anal. Chem.* 22, 685-696.
- Petrovic, M., Gehringer, P., Eschweller, H., Barcelo, D., 2004. LC-MS-(MS) determination of oxidative degradation products of nonylphenol ethoxylates, carboxylates and nonylphenols in water. *Water Sci. Technol.* 50, 227-234.
- Pluemsab, W., Fukazawa, Y., Furuike, T., Nodasaka, Y., Sakairi, N., 2007. Cyclodextrin-linked alginate beads as supporting materials for *Sphingomonas cloacae*, a nonylphenol degrading bacteria. *Bioresour. Technol.* 98, 2076-2081.
- Porter, A.J., Hayden, N.J., 2003. Nonylphenol in the environment: A critical review. University of Vermont: Department of Civil and Environmental Engineering.
- Preuss, T.G., Gehrhardt, J., Shirmer, K., Coors, A., Rubach, M., Russ, A., Jones, P.D., Giesy, J.P. Ratte, H.T., 2006. Nonylphenol isomers differ in estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5147-5153.
- Reed, H.W.B., 1978. Alkylphenols In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 3rd ed., vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., NY.
- Richardson, S.D., 2002. Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 74, 2719-2741.
- Rizzo, L., 2011. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res.* 45, 4311-4340.
- Sabik, H., Gagné, F., Blaise, C., Marcogliese, D.J., Jeannot, R., 2003. Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by

- mussels (*Elliption complanata*). *Chemosphere* 51, 349-356.
- Sancey, B., Crini, G., 2012. Décontamination des effluents de traitement de surface par oxydation/bioadsorption sur cyclodextrine (in French). *Techniques de l'Ingénieur*, 154, 1-12.
- Seidel, A., 2004. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons, Inc., NY.
- Selvaraj, K.K., Shanmugam, G., Sampath, S., Larsson D.G.J. & Ramaswamy, B.R., 2014. GC-MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 99, 13-20.
- Servos, M.R., 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada* 34, 123-177.
- Severin, G.F., Welzl, G., Jüttner, I., Pfister, G., Schramm, K.W., 2003. Effects of nonylphenol on zooplankton in aquatic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2733-2738.
- Shao, B., Hu, J., Yang, M., An, W., Tao, S., 2005. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in river water, drinking water, and fish tissues in the area of Chongqing, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 467-473.
- Sharma, V.K., Anquandh G.A.K., Yngard, R.A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A., Golovko, D., 2009. Nonylphenol, octylphénol, and bisphenol A, in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. *J. Environ. Sci. Health Part A* 44, 423-442.
- Sherrard, K.B., Marriott, P.J., Amiet, R.G., McCormick, M.J., Colton, R., Millington, K., 1996. Spectroscopic analysis of heterogeneous photocatalysis products of nonylphenol- and primary alcohol ethoxylate nonionic surfactants. *Chemosphere* 33, 1921-1940.
- Snyder, S.A., Wert, E.C., Rexing, D.J., Zegers, R.E., Drury, D.D., 2006. Ozone oxidation of endocrine disruptors and pharmaceuticals in surface water and wastewater. *Ozone Sci. Eng.* 28, 445-460.
- Soares, A., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2003a. Biodegradation of nonylphenol in a continuous packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 25, 927-933.
- Soares, A., Guieysse, B., Delgado, O., Mattiasson, B., 2003b. Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria. *Biotechnol. Lett.* 25, 731-738.
- Soares, A., Murto, M., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2006. Biodegradation of nonylphenol in a continuous bioreactor at low temperatures and effects on the microbial population. *Environ. Biotechnol.* 69, 597-606.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* 34, 1033-1049.
- Sole, M., Lopez de Alda, M.J., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K., Barcelo, D., 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* 34, 5076-5083.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., 1991. P-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environ. Health Perspective* 92, 167-171.
- Stasinakis, A.S., 2012. Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 47, 432-440.
- Sun, Q., Deng, S., Huang, J., Yu, G., 2008. Relationship between oxidation products and estrogenic activity during ozonation of 4-nonylphenol. *Ozone Sci. Eng.* 30, 120-126.
- Talmage, M.J., 1994. Environmental and human safety of major surfactants: Alcohol ethoxylates and alkylphenols ethoxylates. Lewis Publishers, Ann Arbor, MI.
- Tanghe, T., Verstraete W., 2001. Adsorption of nonylphenol onto granular activated carbon. *Water Air Soil Pollut.* 131, 61-72.
- Tanghe, T., Devriese, G., Verstraete W., 1998. Nonylphenol degradation in lab scale activated sludge units is temperature dependent. *Water Res.* 32, 2889-2896.

- Tehrani-Bagha, A.R., Nikkar, H., Menger, F.M., Holmberg, K., 2012. Degradation of two persistent surfactants by UV-enhanced ozonation. *J. Surfactants Detergents* 15, 59-66.
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F., Viana, M.T., 2005. Nonylphenol, an intergrated vision of a pollutant. Scientific review. *Appl. Ecology Environ. Res.* 4, 1-25.
- Vincent, M.D., Sneddon, J., 2009. Nonylphenol: An overview and its determination in oysters and wastewaters and preliminary degradation results from laboratory experiments. *Microchem. J.* 92, 112-118.
- Wada, S., Ichikawa, H., Tatsumi, K., 1995. Removal of phenols and aromatic amines from waste by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 304-309.
- Wintgens, T., Gallenkemper, M., Melin, T., 2002. Endocrine disrupter removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. *Desalination* 146, 387-391.
- Wintgens, T., Gallenkemper, M., Melin, T., 2003. Occurrence and removal of endocrine disrupters in landfill leachate treatment plants. *Water Sci. Technol.* 48, 127-134.
- Wintgens, T., Gallenkemper, M., Melin, T., 2004. Removal of endocrine disrupting compounds with membrane processes in wastewater treatment and reuse. *Water Sci. Technol.* 50, 1-8.
- Xing W., Zhuo S.P., Gao X.L., Yuan X., 2009. Adsorption behavior of NPE on ordered mesoporous carbons. *Acta Chim. Sinica.* 67, 1771-1778.
- Yamada, K., Tamura, T., Azaki, Y., Kashiwada, A., Hata, Y., Higashida, K., Nakamura, Y., 2009. Removal of linear and branched p-alkylphenols from aqueous solution by combined use of melB tyrosinase and chitosan beads. *J. Polym. Environ.* 17, 95-102.
- Yamada, K., Inoue, T., Akiba, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., 2006. Removal of p-alkylphenols from aqueous solutions by combined use of mushroom tyrosinase and chitosan beads. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2476-2475.
- Yamazaki, S., Mori, T., Katou, T., Sugihara, M., Saeki, A., Tanimura, T., 2008. Photocatalytic degradation of 4-tert-octylphenol in water and the effect of peroxydisulfate as additives. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 199, 330-335.
- Yang W.B., Ren L., 2010. Adsorption mechanism of nonylphenol polyethoxylate onto hypercrosslinked resins. *Acta Physicochim. Sinica* 26, 2182-2188.
- Yim, B.B., Yoo, Y.G., Maeda, Y., 2003. Sonolysis of alkylphenols in aqueous solution with Fe(II) and Fe(III). *Chemosphere* 50, 1015-1023.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – A review. *Environ. Int.* 28, 215-226.
- Yu, Z., Peldszus, S., Huck, P.M., 2009a. Adsorption of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound by granular activated carbon. 1. Adsorption capacity and kinetics. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1467-1473.
- Yu, Z., Peldszus, S., Huck, P.M., 2009b. Adsorption of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound by granular activated carbon. 2. Model prediction. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1464-1479.
- Yu, Z., Peldszus, S., Huck, P.M., 2008. Adsorption characteristics of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound – Naproxen, carbamazepine and nonylphenol – on activated carbon. *Water Res.* 42, 2873-2882.
- Zhang, Y., Zhou, X., Lin, Y., Zhang, X., 2008. Ozonation of nonylphenol and octylphenol in water. *Fresenius Environ. Bull.* 17, 760-766.
- Zhang, W.L., Li, Y., Mao, K., Li, G.P., 2012. Removal of endocrine disrupting compounds and estrogenic activity from secondary effluents during TiO₂ photocatalysis. *Fresenius Environ. Bull.* 21, 731-735.

3.3 Conclusions & Perspectives

Les molécules organiques à caractère toxique sont aussi connues sous le nom de POPs (Polluants Organiques Persistants) et englobent les HAPs, COVs, APs, PCBs (PolyChloroBiphényles), CPs (Chlorophénols) *etc*, sont ubiquistes et très persistantes dans l'environnement. Ces micropolluants restent difficilement dégradables, s'accumulent le long de la chaîne alimentaire, et par conséquent menacent très fortement la santé humaine : elles sont d'ailleurs particulièrement étudiées chez les animaux supérieurs (*e.g.* Noël *et al.*, 2009 ; D'Ilio *et al.*, 2011 ; Pierce *et al.*, 2011 ; van de Merwe *et al.*, 2011 ; Bendal *et al.*, 2014 ; Costantini *et al.*, 2014 ; Blévin *et al.*, 2014 ; Goutte *et al.*, 2014). Si l'adsorption permet de traiter, parfois très efficacement, des rejets industriels, mais aussi domestiques, ce n'est *de facto* qu'un transfert de pollution : filtre, membrane, ou tout autre support de traitement passe d'un état propre à un état sale.

“Rien ne se perd...”

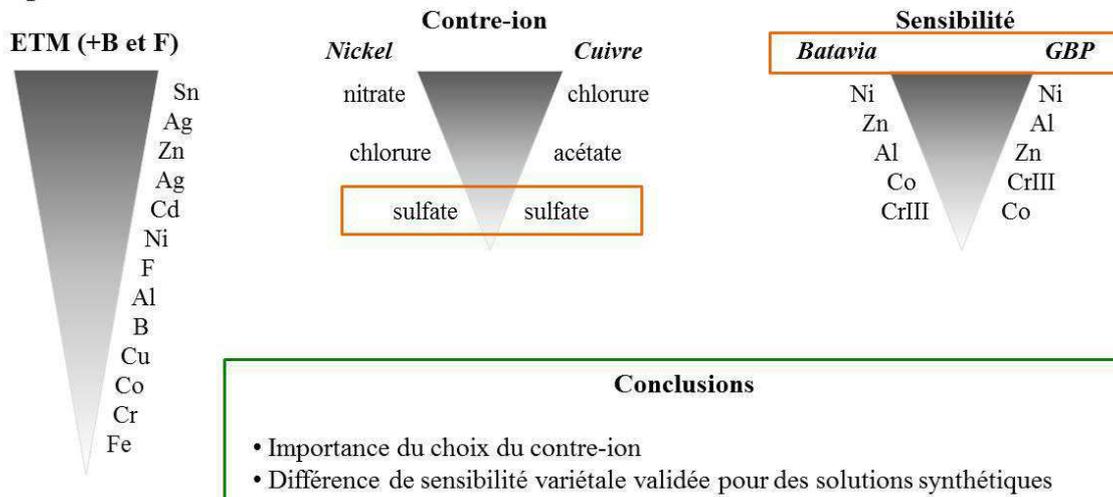
Ce constat quelque peu alarmiste ouvre malgré tout plusieurs voies de recherche :

- poursuivre l'accumulation de données *single tox* des principaux HAPs ainsi que leur produits de dégradation ;
- poursuivre l'accumulation de données de *mixture tox* des principaux HAPs en mélange avec des ETMs ;
- poursuivre l'optimisation des procédés de traitement afin de limiter les déchets, tout en sachant que l'on atteindra un jour une quantité de déchets incompressible. La question qui se posera ne sera alors plus scientifique mais éthique : jusqu'à quel point est-il acceptable de polluer un environnement de façon durable ?
- prendre le problème en amont, chercher, élaborer des molécules plus propres afin de remplacer et d'interdire ces molécules organiques persistantes, comme pour les ChloroFluoroCarbures (CFCs) interdits par le Protocole de Montréal du 16 septembre 1987¹, ou comme les récentes prises de conscience générale des effets néfastes du bisphénol A (biberons, reçus de banque...). L'effort n'est alors plus uniquement scientifiquement mais aussi et surtout politique.

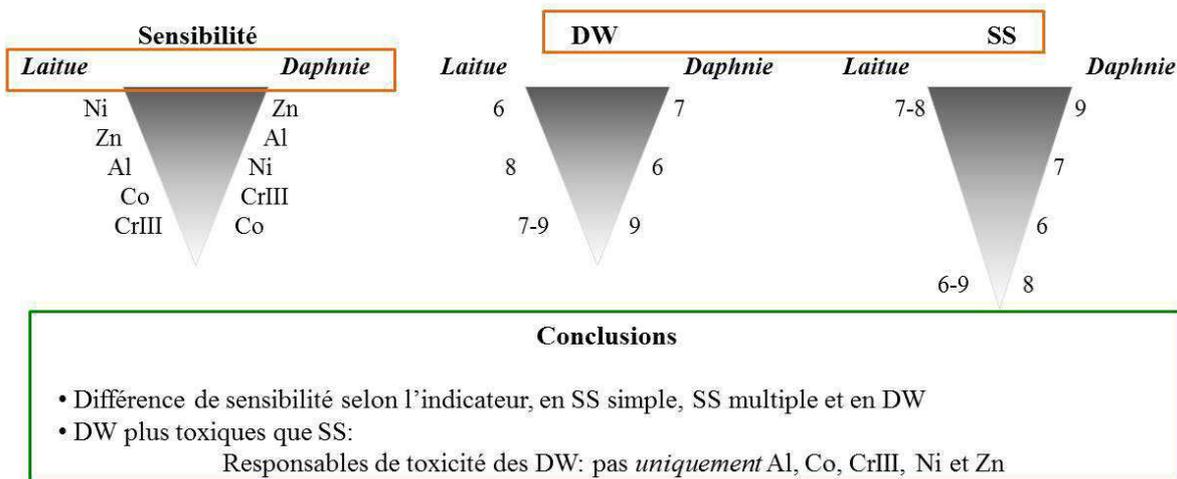
¹ Entré en vigueur le 1^{er} janvier 1989 et ratifié alors par 24 pays. Vingt ans plus tard, 196 pays étaient signataires de ce traité.

BILAN DE LA SECTION III

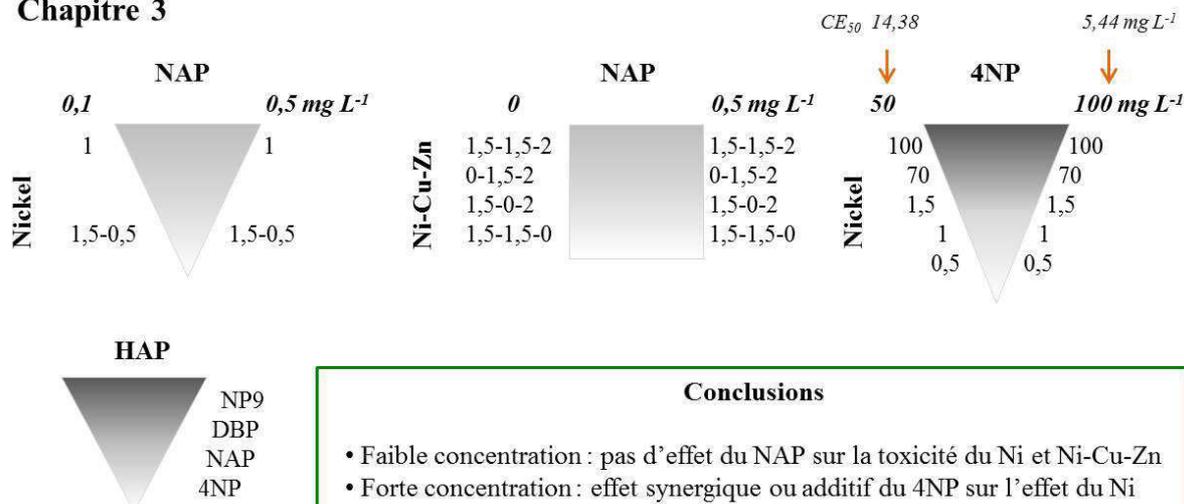
Chapitre 1



Chapitre 2



Chapitre 3



BIBLIOGRAPHIE¹

- Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A.** 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ* 407:1461-1468.
- Badot PM, Degiorgi F, Adam O, Crini G.** 2011. Combined exposure to mixture of chemicals. An impossible challenge? *In* Pesticides – The impacts of pesticide exposure. Stoytcheva M (Ed.), Tech Rijeka, Croatia, 67-90.
- Balabanič D, Rupnik M, Klemenčič A.** 2011. Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. *Reprod Fertil Dev*, 23:403-416.
- Baurand PE., de Vaufleury A, Scheifler R, Capelli N.** 2013. Coupling of Random Amplified Polymorphic DNA Profiles Analysis and High Resolution Capillary Electrophoresis System for the Assessment of Chemical Genotoxicity. *Environ Sci Technol*, 47:9505-9513.
- Becue A, Nguyen R.** 2005. Etude de l'analyse des alkylphénols. Rapport final. INERIS Institut National de l'Environnement industriel et des RISques. 34p.
- Bendall VA, Barber JL, Papachlimitzou A, Bolam T, Warford L, Hetherington SJ, Silva JF, McCully SR, Losada S, Maes T, Ellis JR, Law RJ.** 2014. Organohalogen contaminants and trace metals in North-East Atlantic porbeagle shark (*Lamna nasus*). *Mar Pollut Bull*, 85:280-286.
- Benzarti S, Mohri S, Ono Y.** 2008. Plant response to heavy metal toxicity: comparative study between the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (ecotype Ganges) and nonaccumulator plants: lettuce, radish, and alfalfa. *Environ Toxicol*, 23:607-616.
- Bergé A.** 2012. Identification des sources d'alkylphénols et de phtalates en milieu urbain. Comparaison des rejets à dominante urbaine (domestique) par rapport à des rejets purement industriels. Thèse de Doctorat *ès* Sciences de l'Univers et de l'Environnement, Université de Paris-Est.
- Berryman D, Houde F, DeBlois C, O'Shea M.** 2004. Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. *Chemosphere*, 56:247-255.
- Bi X, Feng X, Yang Y, Qiu G, Li G, Li F, Liu T, Fu Z, Jin Z.** 2006. Environmental contamination of heavy metals from zinc smelting areas in Hezhang County, western Guizhou, China. *Environ Int*, 32:883-890.
- Bliss CI.** 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol*, 26:585-615.
- Charles J.** 2012. Procédés physico-chimiques de décontamination et impact des rejets aqueux de la filière traitement de surfaces : Approches chimique et écotoxicologique. Thèse de Doctorat *ès* Sciences de la Vie et de l'Environnement, Université de Besançon.
- Circulaire.** 2002. Circulaire du 4 février 2002 relative à l'action nationale de Recherche et réduction des rejets de Substances Dangereuses dans l'Eau par les installations classées. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Direction de la prévention des pollutions et des risques & Direction de l'Eau, Paris.

¹ Cette partie regroupe les références bibliographiques citées dans cette section *hors* articles.

- Costantini D, Meillère A, Carravieri A, Lecomte V, Sorci G, Faivre B, Weimerskirch H, Bustamante P, Labadie P, Budzinski H, Chastel O.** 2014. Oxidative stress in relation to reproduction, contaminants, gender and age in a long-lived seabird. *Oecologia*, 175:1107-1116.
- Crosse JD, Shore RF, Jones KC, Pereira MG.** 2012. Long term trends in PBDE concentrations in gannet (*Morus bassanus*) eggs from two UK colonies. *Environ Pollut*, 161:93-100.
- D'Ilio S, Mattei D, Blasi MF, Alimonti A, Bogialli S.** 2011. The occurrence of chemical elements and POPs in loggerhead turtles (*Caretta caretta*): An overview. *Mar Pollut Bull*, 62:1606-1615.
- Directive EC.** 2001. Directive 2001/59/EC adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, Official Journal of the European Communities, L 225/1, 21.08.2001, Brussels.
- Di Salvatore M, Carafa AM, Carratù G.** 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere* 73:1461-1646.
- Druart C, Scheifler R, de Vaufleury A.** 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. *J Hazard Mater*, 184:26-33.
- Druart C, Scheifler R, Millet M, de Vaufleury A.** 2012. Landsnail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. *Appl Soil Ecol*, 53:56-64.
- Eom IC, Rast C, Veber AM, Vasseur P.** 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotox Environ Saf*, 67:190-205.
- Everett DH.** 1972. Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units, Appendix II: Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry. *Pure Appl Chem*, 31:577-638.
- Fjällborg B, Gustafsson N.** 2006. Short-term bioassay responses to sludge products and leachate. *Arch Environ Contam Toxicol*, 51:367-376.
- Fritsch C, Coeurdassier M, Gimbert F, Crini N, Scheifler R, de Vaufleury A.** 2011. Investigations of responses to metal pollution in land snail populations (*Cantareus aspersus* and *Cepaea nemoralis*) from a smelter-impacted area. *Ecotoxicology*, 20:739-759.
- Gao Y, Yu XZ, Wu SC, Cheung KC, Tam NFY, Qian PY, Wong MH.** 2006. Interactions of rice (*Oryza sativa* L.) and PAH-degrading bacteria (*Acinetobacter* sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil. *Sci Tot Environ*, 372:1-11.
- Goutte A, Barbraud C, Meillère A, Carravieri A, Bustamante P, Labadie P, Budzinski H, Delord K, Cherel Y, Weimerskirch H, Chastel O.** 2014. Demographic consequences of heavy metals and persistent organic pollutants in a vulnerable long-lived bird, the wandering albatross. *P Roy Soc EdinB B*, 281:20133313.
- Khan S, Aijun L, Zhang S, Hu Q, Zhu YG.** 2008. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. *J Hazard Mater*, 152:506-515.
- Lefèvre I, Marchal G, Corréal E, Zanuzzi A, Lutts S.** 2009. Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop. *Plant Growth Regul*, 59:1-11.

- Lund T.** 2000. Note d'information sur les perturbateurs endocriniens. Commission de la santé publique et de la politique des consommateurs. Parlement Européen, 1999-2004.
- Ma X, Lian QQ, Dong Q, Ge RS.** 2011. Environmental inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Toxicology*, 285:83-89.
- Manet S.** 2007. Effet de contre-ion sur les propriétés d'amphiphiles cationiques. Thèse de Doctorat ès Chimie-Physique, Université de Bordeaux.
- Mohanapriya S, Senthilkumar P, Sivakumar S, Dineshkumar M, Subbhuraam CV.** 2006. Effects of copper sulfate and copper nitrate in aquatic medium on the restoration potential and accumulation of copper in stem cuttings of the terrestrial medicinal plant, *Portulaca oleracea*. *Environ Monit Assess*, 121:233-244.
- Noël M, Barrett-Lennard L, Guinet C, Dangerfield N, Ross PS.** 2009. Persistent organic pollutants (POPs) in killer whales (*Orcinus orca*) from the Crozet Archipelago, southern Indian Ocean. *Mar Environ Res*, 68:196-202.
- Pauget B, Gimbert F, Coeurdassier M, Scheifler R, de Vaufleury A.** 2011. Use of chemical methods to assess Cd and Pb bioavailability to the snail *Cantareus aspersus*: A first attempt taking into account soil characteristics. *J Hazard Mater*, 192:1804-1811.
- Pierce GJ, Caurant F, Law RJ.** 2011. Bioaccumulation of POPs and toxic elements in small cetaceans along European Atlantic coasts. European Cetacean Society's 25th Annual Conference, Cadiz, Spain.
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP.** 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol*, 8:275-285
- Résolution EC.** 2013¹. Résolution T7-0091/2013 du Parlement Européen du 14 mars 2013 sur la protection de la santé publique contre les perturbateurs endocriniens, adopté en lecture unique, Strasbourg.
- Regulation EC.** 2006. Regulation 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of the 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) n° 793/93 and Commission Regulation (EC) n° 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EEC and 2000/21/EC, Official Journal of the European Communities, L 304, 22.11.2007, Brussels.
- Sancey B.** 2011. Développement de la bio-adsorption pour décontaminer des effluents de rejets industriels : Abattement chimique et gain environnemental. Thèse de Doctorat ès Sciences de la Vie et de l'Environnement, Université de Besançon.
- UNECE.** 1998². Protocol to the 1979 Convention on long-range transboundary air pollution on Persistent Organic Pollutants POPs. United Nations Economic Commission for Europe, Aarhus.
- Van de Merwe JP, Hodge M, Olszowy HA, Whittier JM, Lee SY.** 2010. Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Mar Pollut Bull*, 60:579-588.
- Verlière G, Heller R.** 1981. Effets du nickel sur la croissance des racines isolées de *Leucaena leucocephala* (Lam.) et caractères de son absorption. *Phys Behav*, 19:263-275.

¹ <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?type=TA&language=FR&reference=P7-TA-2013-91>

² http://www.unece.org/env/lrtap/pops_h1.html

Wang W, Keturi PH. 1990. Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. *Water Air Soil Pollut*, 52:369-376.

Weltje L. 1998. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere*, 36:2643-2660.

Young BJ, Riera NI, Beily ME, Bres PA, Crespo DC, Ronco AE. 2012. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 76:182-186.

IV. DISCUSSION GENERALE

POUR FINIR...

Je voudrais tout d'abord poursuivre et généraliser la discussion de l'article présenté dans le Chapitre 2 de la Section II¹. Les résultats de ces expériences sont multiples, complexes et soulèvent également plusieurs questions.

Premièrement, et c'est sur cela sans doute que tout repose : comment du cadmium a-t-il pu être dosé dans des semences ? Comme mentionné dans l'article, il a été démontré que l'adjonction de produits phosphatés (engrais et/ou pesticides) induise la présence de Cd dans les plants traités (Mattson *et al.*, 2002 ; Nan *et al.*, 2002), et donc dans les semences : malgré leur rôle protecteur, les semences sont perméables à certains ETMs comme le plomb, le nickel ou encore le cadmium. Ce dernier est séquestré particulièrement dans le péricarpe de la semence (Moise *et al.*, 2005 ; Seregin & Kozhevnikova, 2005 ; Kranner & Colville, 2011). Il serait alors légitime de se demander si ces différences initiales de Cd ne sont pas l'unique raison de l'observation de différences de réponses écotoxicologiques entre les différentes variétés testées ? Et s'il n'eut pas fallu répondre à toutes ces questions *avant* d'entreprendre de telles expériences (*e.g.* test des différentes eaux pour les témoins ; *cf.* Section II, Chapitre 1). A ces deux questions, je répondrai que si le Cd est présent dans les semences (en tout cas pour celles des variétés Appia et Batavia) et qu'il était effectivement la seule explication des différences écotoxicologiques, les témoins de tous les tests réalisés au cours de ce doctorat auraient dû également pâtir de la présence de cet ETMss, ce qui n'est pas le cas : tous les taux de germination témoins de tous les tests présentés, quelle que soit la variété utilisée, étaient supérieurs ou égaux à 90 %, et les plantules ne présentaient pas d'altérations morphologiques spécifiques (nécroses, rachitisme racinaire et/ou total, développement de racines supplémentaires...). La première perspective, indispensable, que j'envisagerais donc à ce travail, serait d'analyser également les semences de Kinemontepas et de Grosse Blonde Paresseuse afin de confirmer ou d'infirmer la présence de Cd, ainsi que de reproduire ces expériences avec des semences d'origine biologique (*i.e.* certification d'absence de traitement pesticide et d'ajout d'engrais à la culture des plants mères).

¹ Il ne s'agit pas ici d'un *mea culpa*, mais bien de la poursuite de la discussion de ces résultats qui pourraient mettre en balance l'intégralité de mon travail de thèse.

Deux objectifs principaux ont été définis, contextualisés et présentés dans l'introduction de ce mémoire :

- réévaluation du protocole de germination de *Lactuca sativa* via l'étude de la variabilité de ses réponses écotoxicologiques ;
- estimation et classement des principaux ETMs selon leur écotoxicité via la réalisation de solutions synthétiques mono- ou poly-contaminées.

En tant que doctorante, je me suis appliquée à apporter des éléments de réponses à chacune de ces questions. Les résultats générés, présentés, analysés et discutés ouvrent enfin de nouvelles perspectives de recherche, qui seront développées à la fin de cette section.

Deux aspects de la variabilité des réponses écotoxicologique de la laitue lors de tests de germination standards ont été étudiés :

- une approche méthodologique qui a permis de mettre en évidence, après une analyse bibliographique fournie, la variabilité des paramètres du test "laitue". Nous avons testé l'influence de certains de ces paramètres et relevé sur les résultats écotoxicologiques :
 - la non-incidence de la densité des semences disposées dans les boîtes de Pétri sur le taux de germination, les longueurs racinaires et totales des plantules. SECTION II – Chapitre 1
 - la non-incidence de la qualité de l'eau de contrôle utilisée comme témoin, solvant ou diluant sur le taux de germination, les longueurs racinaires et totales des plantules. SECTION II – Chapitre 1
 - l'incidence de la variété de laitue choisie pour ce test, dans le cadre d'évaluation de rejets. SECTION II – Chapitres 1 & 2
 - l'ordre de sensibilité défini en comparant les réponses écotoxicologiques des plantules des différentes variétés présente toujours la même variété comme étant la plus résistante et la plus sensible. SECTION II – Chapitres 1 & 2
- une approche plus physiologique qui a permis de :
 - confirmer des différences variétales, pour les semences. SECTION II – Chapitre 2
 - discriminer les deux tendances de réaction aux polluants (accumulation, excretion...). Ces stratégies cellulaires et organiques semblent correctement expliquer les différences écotoxicologiques relevées. SECTION II – Chapitre 2

- confirmer de précédents travaux, concernant des différences de réponses écotoxicologiques :
 - *entre espèces*, arrosées de solutions synthétiques (*e.g.* Di Salvatore *et al.*, 2008), ou au contact de boues industrielles (*e.g.* Renoux *et al.*, 2001 ; Antoniadis & Alloway, 2001 ; Araujo & Montero, 2005 ; Araujo *et al.*, 2011) ;
 - *entre variétés de soja* : assimilations différentielles de zinc (Earley, 1943 et White, 1976 reportés par Foy *et al.*, 1978) ;
 - *entre variétés de laitues* : réaction différentes à la salinité du milieu (Pasternak *et al.*, 1986 ; Zapata *et al.*, 2003 ; Nasri *et al.*, 2011)

Les déchets industriels, notamment les rejets-eaux (les boues et rejets atmosphériques n'ayant pas été étudiés dans ce travail de doctorat), sont des *cocktails* de polluants, complexes et la responsabilité de la “gueule de bois” toxique ne peut pas être imputée à un seul composant : comme pour tout mélange, on observe des phénomènes d'additivité, de synergie, d'antagonisme, d'opposition, ... Il faut néanmoins connaître les effets individuels avant de pouvoir envisager et modéliser les réactions générées par les mélanges binaires, ternaires et encore plus complexes (addition de molécules organiques). Ainsi, nous avons pu classer différentes substances selon leur toxicité croissante :

- ETMs : Fe, Cr, Co, Cu, B, Al, F, Ni, Cd, Ag, Zn, Sn. SECTION III – Chapitre 1
 - Notons à nouveau des différences variétales de sensibilité,
- Notons à nouveau des différences variétales entre
 - Vis-à-vis de la Batavia dorée de printemps : Cr, Co, Al, Zn, Ni
 - Vis-à-vis de la Grosse Blonde Paresseuse : Co, Cr, Zn, Al, Ni

SECTION III – Chapitre 1

Nous avons même pu comparer ces valeurs à celles trouvées pour un autre organisme, utilisé très largement comme bio-indicateur écotoxicologique : *Daphnia magna* : Co, Cr, Ni, Al, Zn.

SECTION III – Chapitre 2

Si nous avons montré que le choix de la variété du bio-indicateur portait une part de responsabilité dans la variabilité des réponses écotoxicologiques de la laitue (en plus de la composition des rejets industriels), le choix du contre-ion (chlorure, nitrate, sulfate, acétate) du métal testé en solution synthétique n'est pas moins anodin.

SECTION III – Chapitre 1

Les mélanges polycontaminés synthétiques sont très complexes à générer et à étudier. En effet, si comme pour toute expérimentation il faut créer un protocole précis et cohérent, le contexte particulier de nos expériences impose de jouer aussi avec les contraintes propres de chaque élément métallique et organique testé (densité, solubilité, gamme de pH...)

SECTION III – Chapitres 1, 2, et 3

L'explication des différences intervariétales est importante, surtout dans un contexte écotoxicologique et d'élaboration de diagnostics environnementaux. Dans ce but et en plus des propositions faites dans ce manuscrit, on pourra envisager d'étudier :

- les bio-marqueurs de stress en général (*e.g.* Lagadic *et al.*, 1997), les Heat Shock Proteins HSPs en particulier (*e.g.* Wang *et al.*, 2004 ; Timperio *et al.*, 2088 ; Ben Fredj *et al.*, 2014), et tenter de répondre aux questions suivantes : à partir de quel stade de développement sont-elles mesurables et sont-elles un marqueur pertinent d'une pollution environnementale sur *Lactuca sativa* ? Les RITS ont-ils des effets spécifiques sur ces molécules ?;
- le cadmium. Il est parmi les métaux les plus étudiés (*e.g.* sur les plantes, *cf.* [Tableau V.1.b](#)). L'expérience de Xue *et al.* (2014) sur les effets délétères du Cd sur l'activité photosynthétique de jeunes pousses de soja pourrait être transposée à la laitue et à ses différentes variétés, et permettrait de compléter les informations dont nous disposons déjà ;
- les phytochélatines, peptides capables de se complexer avec des éléments métalliques via une liaison thiol, sont particulièrement impliquées dans les réponses des plantes face aux stress de pollutions métalliques puisqu'elles permettent la séquestration du complexe formé avec les éléments métalliques dans une vacuole (*e.g.* Grill *et al.*, 1985 ; Grill *et al.*, 1986 ; Ranieri *et al.*, 2005 ; Uzu, 2009 ; Pal & Rai, 2010 ; Foltête *et al.*, 2012 ; Fisher *et al.*, 2014) ;
- les phénomènes épigénétiques, qui pourraient permettre de comprendre les modifications des mécanismes de résistance (ou de tolérance) de la laitue face aux pollutions environnementales (RI en général, RITS en particulier, solutions synthétiques, pollutions chroniques *vs* aiguës *etc.*), les différences variétales, ainsi que d'éventuelles transmissions aux générations suivantes (*e.g.* Habu *et al.*, 2001 ; Feng *et al.*, 2010 ; Feil & Fraga, 2012) ;
- *in situ*, (i) les interactions éventuelles des RITS avec d'autres polluants déjà présents dans le milieu récepteur comme les médicaments ou les pesticides (*e.g.* Zhou *et al.*, 2013 ; Rocha *et al.*, 2014), (ii) réaliser un cycle court d'accumulation de polluants (métalliques et/ou organiques) après irrigation de RITS (*e.g.* Manzano *et al.*, 2014 ; [Figure IV.1](#)).

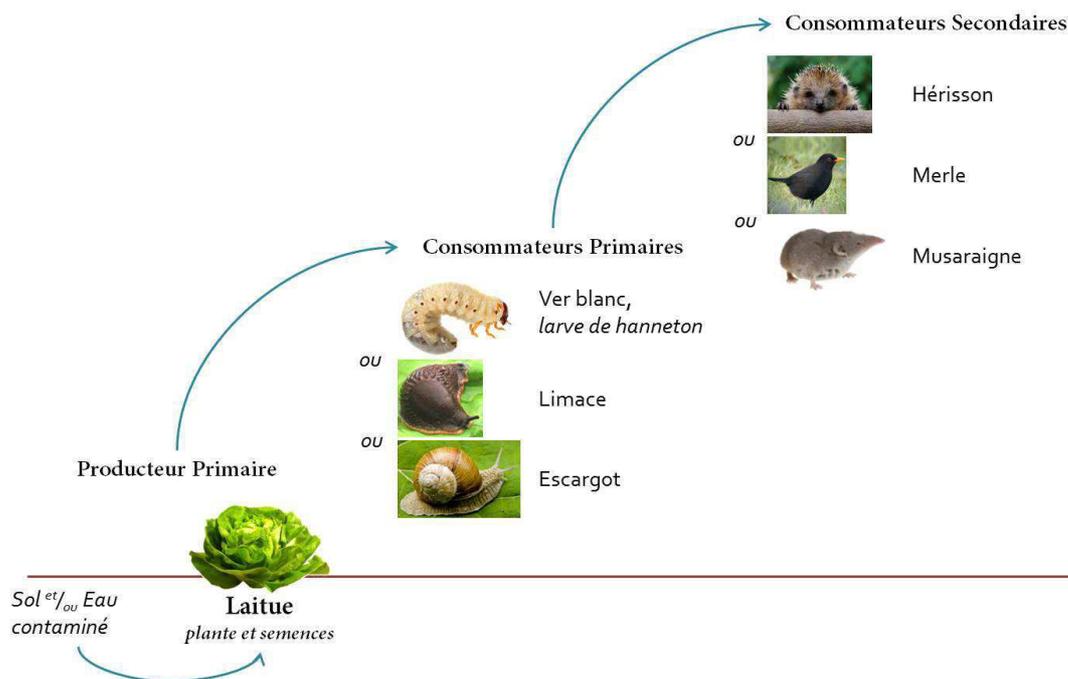


Figure IV.1. Bioaccumulation : cycle court.

Pour finir, n'oublions pas que si les Shadocks expriment joyeusement leur état de doute permanent par un « *La vérité est qu'il n'y a pas de vérité, y compris celle-ci* », Desproges l'a aussi manifesté par un très concis « *La seule certitude que j'ai, c'est d'être dans le doute* » et Anaxagore l'avait formulé il y a bien longtemps par un très grec repris en latin « *Ab esse ad posse valet, a posse ad esse non valet consequentia* »¹.

¹ « *De l'existence d'une chose on conclut à sa possibilité ; de la possibilité d'une chose on ne peut conclure à son existence* ».

BIBLIOGRAPHIE

- Antoniadis V, Alloway BJ.** 2001. Availability of Cd, Ni and Zn to ryegrass in sewage sludge-treated soils at different temperatures. *Water Air Soil Pollut*, 132:201-214.
- Araújo ASF, Monteiro RTR.** 2005. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Sci Agric*, 62:286-290.
- Araújo ASF, Sahyoun FK, Monteiro RTR.** 2001. Evaluation of toxicity of textile sludge compost on seed germination and root elongation of soybean and wheat. *Rev Ecosistema*, 26:117-119.
- Ben Fredj F, Wali A, Khadhraoui M, Han J, Funamizu N, Ksibi M, Isoda H.** 2014. Risk assessment of heavy metal toxicity of soil irrigated with treated wastewater using heat shock proteins stress responses: case of El Hajeb, Sfax, Tunisia. *Environ Sci Pollut Res*, 21:4716-4726.
- Di Salvatore M, Carafa AM, Carratù G.** 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73:1461-1646.
- Earley EB.** 1943. Minor element studies with soybeans. I. Varietal reactions to concentrations of zinc in excess of the nutritional requirement. *J Am Soc Agron*, 35:1012-23.
- Feil R, Fraga MF.** 2012. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet*, 13:97-109.
- Feng S, Jacobsen SE, Reik W.** 2010. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330:622-627.
- Fischer S, Kuehnlentz T, Thieme M, Schmidt H, Clemens S.** 2014. Analysis of plant Pb tolerance at realistic submicromolar concentrations demonstrates the role of phytochelatin synthesis for Pb detoxification. *Environ Sci Technol* 48:7552-7559.
- Foltête AS, Masfaraud JF, Férard JF, Cotelle S.** 2012. Is there a relationship between early genotoxicity and life-history traits in *Vicia faba* exposed to cadmium-spiked soils ?, *Mut Res/Gen Tox Env Mut*, 747:159-163.
- Foy CD, Chaney RL, White MC.** 1978. The Physiology of metal toxicity in plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 29:511-566.
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH.** 1985. Phytochelatin: The principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230:674-676.
- Grill E, Gekeler W, Winnacker EL, Zenk MH.** 1986. Homo-phytochelatin are heavy metal-binding peptides of homo-giutathione containing Fabales. *FEBS Letters* 205:47-50.
- Habu Y, Kakutani T, Paszkowski J.** 2001. Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 11:215-220.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F.** 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : Aspects fondamentaux. Dunod, Paris, 419p.
- Nasri N, Kaddour R, Rabhi M, Plassard C, Lachaal M.** 2011. Effect of salinity on germination, phytase activity and phytate content in lettuce seedling. *Acta Physiol Plant*, 33:935-942.
- Pal R, Rai JPN.** 2010. Phytochelatin: Peptides involved in heavy metal detoxification. *Appl Biochem Biotechnol*, 160:945-963.

- Pasternak D, DeMalach Y, Borovic I, Shram M, Aviram C.** 1986. Irrigation with brackish water under desert conditions, IV. Salt tolerance studies with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agr Water Manage*, 11:303-311.
- Ranieri A, Castagna A, Scebba F, Careri M, Zagnoni I, Predieri G, Pagliari M, Sanità di Toppi L.** 2005. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiol Bioch*, 43:45-54.
- Renoux AY, Tyagi RD, Samson R.** 2001. Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. *Water Res*, 35:1415-1424.
- Rocha R, Gonçalves F, Marques C, Nunes B.** 2014. Environmental effects of anticholinesterase therapeutic drugs on a crustacean species, *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res*, 21:4418-4429.
- Timperio AM, Egidi MG, Zolla L.** 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *J Proteomics*, 71:391-411.
- Uzu, G.** 2009. Spéciation, transfert vers les végétaux et approche toxicologique des émissions atmosphériques d'une usine de recyclage de plomb. Thèse de Doctorat *ès Biogéochimie de l'environnement*, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A.** 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci*, 9:244-252.
- White MC.** 1976. Differential varietal tolerance in soybean (*Glycine max* L.) to phytotoxic levels of zinc in a Sassafras sandy loam. Master Thesis, University. Maryland.
- Xue Z, Gao H, Zhao S.** 2014. Effects of cadmium on the photosynthetic activity in mature and young leaves of soybean plants. *Environ Sci Pollut Res*, 21:4656-4664.
- Zapata PJ, Serrano M, Pretel MT, Amorós A, Botella M.** 2003. Changes in ethylene evolution and polyamine profiles of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. *Plant Sci*, 164:557-563.
- Zhou CF, Wang YJ, Li CC, Sun RJ, Yu YC, Zhou DM.** 2013. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environ Pollut*, 180:71-77.

V. ANNEXES

TABLEAUX & FIGURES

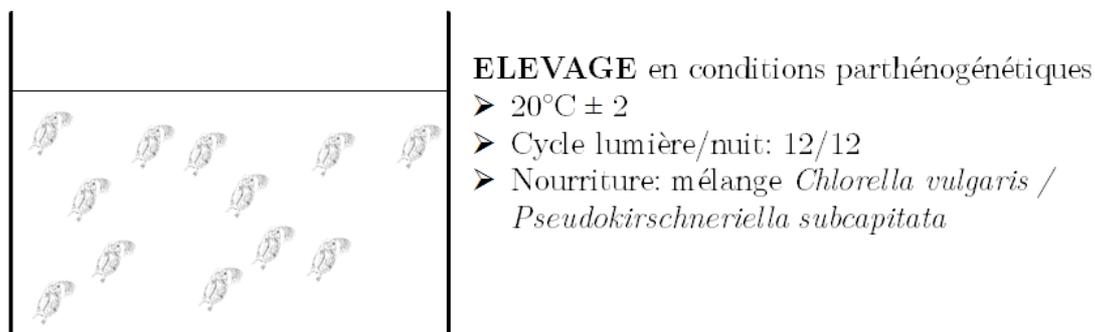


Figure V.2. Elevage type de daphnie *Daphnia magna*, en conditions de laboratoire (Sources : Boillot, 2008 ; Zeman, 2008).

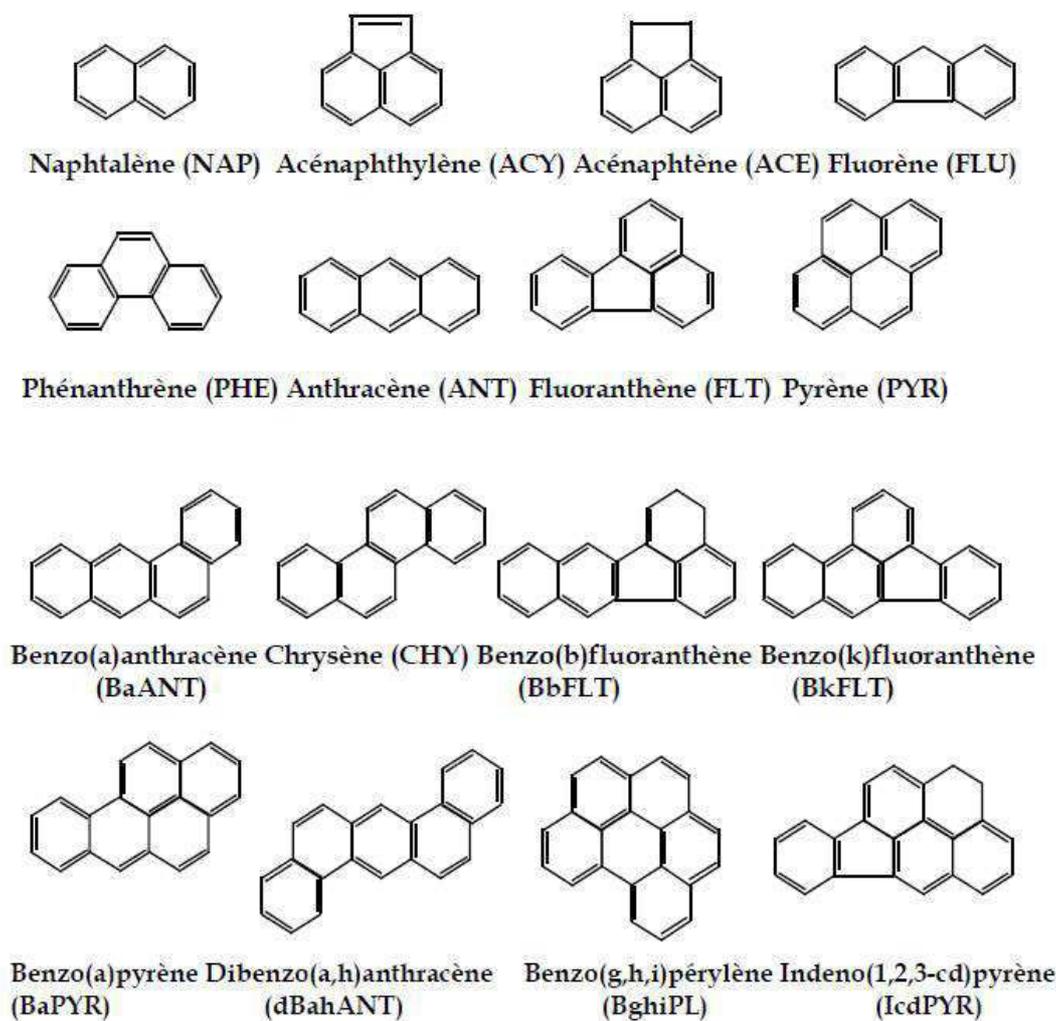


Figure V.3. Liste des 16 HAP classés prioritaires par US EPA¹ (1976) et leur formule.

¹ <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants-background.cfm>

Tableau V.1.a : Références bibliographiques du tableau de synthèse I.7.

Elément	Références bibliographiques
B	Nable <i>et al.</i> , 1997 ; Bañuelos <i>et al.</i> , 1999 ; Liu <i>et al.</i> , 2000 ; Goldberg <i>et al.</i> , 2003 ; Gunes <i>et al.</i> , 2006 ; Cervilla <i>et al.</i> , 2007 ; Eraslan <i>et al.</i> , 2007 ; Ölçer & Kocaçaliskan , 2007 ; Reid, 2007 ; Tanaka & Fujiwara , 2008 ; Herrera-Rodriguez <i>et al.</i> , 2010.
Cl	Brungs, 1973 ; Smith, 1973 ; Piri, 1991 ; Haouala <i>et al.</i> , 2007.
Cu	Adriano, 1986 ; Pålsson, 1989 ; Stadtman & Oliver, 1991 ; Picini & Malavolta, 1992 ; Adalsteinsson, 1994 ; Meharg, 1994 ; Ouzounidou <i>et al.</i> , 1994 ; Baker & Senft, 1995 ; Juste <i>et al.</i> , 1995 ; Marschner, 1995 ; Ciscato <i>et al.</i> , 1997 ; Doncheva, 1998 ; Kastori <i>et al.</i> , 1998 Gupta <i>et al.</i> , 1999 ; Hegedüs <i>et al.</i> , 2001 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001 ; Lewis <i>et al.</i> , 2001 ; McFarlane & Burchett, 2001 ; Brun <i>et al.</i> , 2003 ; Parent & Rivest, 2003 ; Fjällborg <i>et al.</i> , 2005 ; Inaba & Takenaka, 2005 ; Sheldon & Menzies, 2005 ; Ali <i>et al.</i> , 2006 ; Fjällborg <i>et al.</i> , 2006 ; Lefevre <i>et al.</i> , 2009 ; Naaz & Pandey, 2010.
Fe	Brown & Ambler, 1974 ; Mengel & Kirby, 1987 ; Römheld & Marschner, 1990 ; Ganmore-Neumann <i>et al.</i> , 1992 ; Göransson, 1993 ; Cakmak <i>et al.</i> , 1994 ; Marschner & Römheld, 1994 ; Kampfenkel <i>et al.</i> , 1995 ; Sinha <i>et al.</i> , 1997 ; Ling <i>et al.</i> , 1999 ; Arora <i>et al.</i> , 2002 ; Takahashi <i>et al.</i> , 2003 ; Becker & Asch, 2005 ; de Dorlodot <i>et al.</i> , 2005 ; Xing <i>et al.</i> , 2010.
Mn	Clarimont <i>et al.</i> , 1986 ; Horigushi, 1988 ; Horst, 1988 ; Le Bot <i>et al.</i> , 1990 ; Langheinrich <i>et al.</i> , 1992 ; Wu, 1994 ; Bachman & Miller, 1995 ; Foy <i>et al.</i> , 1995 ; Kitao <i>et al.</i> , 1997 ; Gonzalez & Lynch, 1999.
Mo	Chatterjee & Nautiyal, 2001 ; Nautiyal & Chatterjee, 2004 ; Mc Grath <i>et al.</i> , 2010.
Ni	Mengel & Kirby, 1987 ; Pandolfini <i>et al.</i> , 1992 ; Ros <i>et al.</i> , 1992 ; Espen <i>et al.</i> , 1997 ; Das <i>et al.</i> , 1997 ; L'Huillier <i>et al.</i> , 1997 ; Samantaray <i>et al.</i> , 1997 ; Dousset <i>et al.</i> , 1999 ; Zornoza <i>et al.</i> , 1999 ; Zomoza <i>et al.</i> , 1999 ; Gonnelli <i>et al.</i> , 2001 ; Pandey & Sharma, 2002 ; Rahman <i>et al.</i> , 2005 ; Gajewska <i>et al.</i> , 2006 ; Di Salvatore <i>et al.</i> , 2008.
Zn	Marschner, 1986 ; Van Assche & Clijsters, 1986 ; Pålsson, 1989 ; Cakmak & Marschner, 1988 ; Chaney, 1993 ; Kochian, 1993 ; Loué, 1993 ; Ndzono <i>et al.</i> , 1994 ; Choi <i>et al.</i> , 1996 ; Baranowsak <i>et al.</i> , 1996 ; Ebbs & Kochian, 1997 ; Fontes & Cox, 1998 ; Hagemeyer, 1999 ; Prasad <i>et al.</i> , 1999 ; Prasad & Stzalka, 1999 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001 ; Monnet <i>et al.</i> , 2001 ; Fjällborg <i>et al.</i> , 2005 ; Fjällborg <i>et al.</i> , 2006 ; Vaillant <i>et al.</i> , 2005 ; Lefevre <i>et al.</i> , 2009 ; Ozdener & Kutbay, 2009.

ETMpt
+ B
+ Cl

Tableau V.1.b : Références bibliographiques du tableau de synthèse I.7.

Elément	Références bibliographiques
Al	Rout <i>et al.</i> , 2001 ; Marschner, 2012.
Ag	Hirsch, 1998 ; Ratte, 1999 ; Mikelova <i>et al.</i> , 2007.
As	Marin <i>et al.</i> , 1993 ; Carbonell <i>et al.</i> , 1998 ; Burló <i>et al.</i> , 1999 ; Meharg & Harley-Whitaker, 2002 ; Patra <i>et al.</i> , 2004.
Cd	Haghiri, 1973 ; Mathys, 1975 ; Mitchell <i>et al.</i> , 1978 ; Pålsson, 1989 ; Somashekaraiah <i>et al.</i> , 1992 ; De Filippis & Ziegler, 1993 ; Alcantara <i>et al.</i> , 1994 ; Costa & Morel, 1994 ; Inouhe <i>et al.</i> , 1994 ; Fodor <i>et al.</i> , 1995 ; Hernandez <i>et al.</i> , 1996 ; Küpper <i>et al.</i> , 1996 ; Das <i>et al.</i> , 1997 ; Ouariti <i>et al.</i> , 1997 ; Ouzounidou <i>et al.</i> , 1997 ; Tukendorf <i>et al.</i> , 1997 ; Sanita di Toppi & Gabbrielli, 1999 ; Ramos <i>et al.</i> , 2002 ; Wojcik & Tukiendore, 2005 ; Mohanpuria <i>et al.</i> , 2007 ; Guo <i>et al.</i> , 2008 ; Kuriakose & Prasad, 2008 ; Lefevre <i>et al.</i> , 2009 ; Monteiro <i>et al.</i> , 2009 ; Siddiqui <i>et al.</i> , 2009 ; Gallego <i>et al.</i> , 2012 ; Xue <i>et al.</i> , 2014.
Cr	Clijters & Van Assche, 1985 ; Bishnoi <i>et al.</i> , 1993 ; Schmöger, 2001 ; Zeid, 2001 ; Boonyapookana <i>et al.</i> , 2002 ; Shanker <i>et al.</i> , 2003.
Sn	Romney <i>et al.</i> , 1975 ; Hamasaki <i>et al.</i> , 1995.
F	Weinstein, 1977 ; Barbier <i>et al.</i> , 2010.
Hg	Zhang & Tyerman, 1999 ; Messer <i>et al.</i> , 2005 ; Cargnelutti <i>et al.</i> , 2006 ; Zhou <i>et al.</i> , 2007.
Pb	Hewilt, 1953 ; Baker, 1972 ; Huang <i>et al.</i> , 1974 ; Miller <i>et al.</i> , 1975 ; Mukherji & Maitra, 1976 ; Nakos, 1979 ; Mrozek & Funicelli, 1982 ; Khan & Khan, 1983 ; Goldbold & Hutterman, 1986 ; Juwarkar & Shende, 1986 ; Stiborova <i>et al.</i> , 1986 ; Pålsson, 1989 ; Kumar <i>et al.</i> , 1992 ; Sudhakar <i>et al.</i> , 1992 ; Reddy <i>et al.</i> , 2005.

Article consultable pour tous les « heavy metals » : Yadav, 2010

Tableau V.2. : Valeurs des CE₅₀ d'ETMs (+ bore et fluorure) selon l'élément et selon le complexe élément plus contre-ion.¹

Elément x	Contre Ion	Complexe Cplx	PM Cplx [g mol ⁻¹]	PM x [g mol ⁻¹]	PM x/PM Cplx	CE50 x [mg L ⁻¹]	CE50 Cplx [mg L ⁻¹]
Ag ¹							
Ag ²	SO ₄	Ag ₂ SO ₄	311,736	107,686	0,345	37,54	108,673
Al	SO ₄	Al ₂ (SO ₄) ₃ ,18H ₂ O	665,96	26,98	0,041	132,8	3277,965
B	SO ₄	H ₃ BO ₃	61,811	10,811	0,175	151,76	867,675
Cd	SO ₄	3(CdSO ₄),8H ₂ O	769,233	112,411	0,146	64,37	440,486
Co	SO ₄	CoSO ₄	154,930	58,930	0,380	240,5	632,287
Cr	SO ₄	CrK(SO ₄) ₂ ,12H ₂ O	499,098	52	0,104	264	2533,882
	CH ₃ COO	Cu(CH ₃ COO) ₂	181,546		0,350	101,89	291,092
Cu	Cl ₂	CuCl ₂ ,2H ₂ O	170,446	63,546	0,373	87,37	234,348
	SO ₄	Cu(SO ₄),5H ₂ O	249,546		0,255	172,7	678,195
Fe	SO ₄	FeSO ₄ ,7H ₂ O	277,84	55,84	0,201	496,6	2470,905
	Cl ₂	NiCl ₂ ,6H ₂ O	237,59		0,247	43,92	177,798
Ni	NO ₃	Ni(NO ₃) ₂ ,6H ₂ O	290,69	58,69	0,202	26,65	131,997
	SO ₄	NiSO ₄ ,6H ₂ O	262,69		0,223	68,5	306,598
Sn	SO ₄	Sn(SO ₄)	214,71	118,71	0,553	26,72	48,328
Zn	SO ₄	ZnSO ₄ ,7H ₂ O	290,39	65,39	0,225	46,5	206,501

¹ pH = 5.5² pH = 8.5

Les ordres de toxicité sont différents selon que l'on considère uniquement l'élément métallique ou le complexe formé avec le contre-ion (ordre décroissant) :

- ETM seul : NiNO₃/Sn/Ag¹/NiCl₂/Zn/Ag²/Cd/NiSO₄/F/CuCl₂/CuCH₃COO/Al/B/CuSO₄/Co/Cr/Fe ;
- ETM + contre ion : Sn/Ag¹/NiNO₃/Ag²/NiCl₂/Zn/CuCl₂/CuCH₃COO/NiSO₄/Cd/Co/CuSO₄/B/Fe/Cr/Al/F.

¹ Tests de germination réalisés sur *Lactuca sativa* var Batavia dorée de printemps.

Tableau V.3. : Equivalence des masses/concentration des cendres déposées par boîte de Petri [g L⁻¹].

Protocole	Masse g boîte ⁻¹	Concentration g L ⁻¹
II1	0,2	33,333
	0,4	66,666
III1	0,004	0,667
	0,02	3,333
	0,04	6,666
	0,1	16,666
	0,2	33,333
	0,4	66,666
	0,6	100
	0,8	133,333
	1	166,666
II2	0,025	6,25
	0,05	12,50
	0,1	25
	0,25	62,5

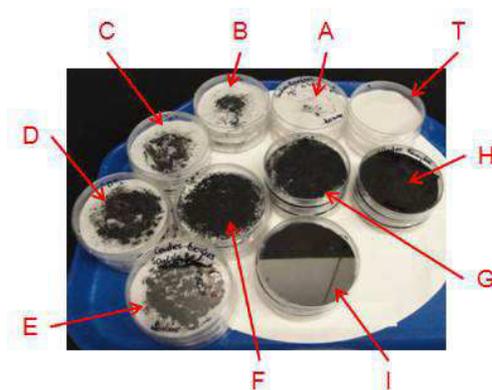


Figure V.4. Protocole III1 de l'étude préliminaire I, menée à l'ETS de Montréal (Québec, Canada) sur l'évaluation de la toxicité de cendres en concentrations croissantes (T les témoins, puis de A à I).

BIBLIOGRAPHIE

TABLEAUX V.1.A ET B

- Adalsteinsson S.** 1994. Compensatory root growth in winter wheat: effects of copper exposure on root geometry and nutrient distribution. *J Plant Nutr*, 17:1501-1512.
- Adriano DC.** 1986. Trace Elements in Terrestrial Environment, Springer, New York, 871p.
- Alcántara E, Romera FJ, Cañete M, Manuel D.** 1994. Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe (III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *J Exp Bot*, 45:1893-1898.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC.** 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci India*, 82:1227-1238.
- Ali MB, Singh N, Shohael AM, Hahn EJ, Paek KY.** 2006. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Sci*, 171:147-154.
- Bachman GR, Miller WB.** 1995. Iron chelate inducible iron/manganese toxicity in zonal geranium. *J Plant Nutr*, 18:1917-1929.
- Barker WG.** 1972. Toxicity levels of mercury, lead, copper, and zinc in tissue culture systems of cauliflower, lettuce, potato, and carrot. *Can J Bot*, 50:973-976.
- Baker DE, Senft JP.** 1995. Copper. *In Heavy metals in soils*. Alloway BJ (Ed.), Blackie Academic and Professional, London, 224-243.
- Bañuelos GS, Ajwa HA, Caceres L, Dyer D.** 1999. Germination responses and boron accumulation in germplasm from Chile and the United States grown with boron-enriched water. *Ecotox Environ Safety*, 43:62-67.
- Baranowska, M., Krupa, Z., & Orzol, D.** (1996). Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants?. *Acta physiologiae plantarum*, 18:147-151.
- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM.** 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem-Biol Interac*, 188:319-333.
- Becker M, Asch F.** 2005. Iron toxicity in rice – conditions and management concepts. *J Plant Nutr Soil Sci*, 168:558-573.
- Bishnoi NR, Chugh LK, Sawhney SK.** 1993. Effect of Chromium on Photosynthesis, Respiration and Nitrogen Fixation in Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings. *J Plant Physiol*, 142:25-30.
- Boonyapookana B, Upatham ES, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Singhakaew S.** 2002. Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duckweed *Wolffia globosa*. *Int J Phytorem* 4:87-100.
- Brown JC, Ambler JE.** 1974. Iron-stress response in tomato (*Lycopersicon esculentum*) 1. Sites of Fe reduction, absorption and transport. *Physiol Plantarum*, 31:221-224.
- Brun LA, Le Corff J, Maillet J.** 2003. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. *Environ Pollut*, 122:361-368.
- Brungs WA.** 1973. Effects of residual chlorine on aquatic life. *J Water Pollut Con F*, 45:2180-2193.

- Burlo F, Guijarro I, Carbonell-Barrachina AA, Valero D, Martinez-Sanchez F.** 1999. Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants. *J Agr Food Chem*, 47:1247-1253.
- Cakmak I, Marschner H.** 1988. Increase in membrane permeability and exudation in roots of zinc deficient plants. *J Plant Physiol*, 132:356-361.
- Cakmak S, Gülüt KY, Marschner H, Graham RD.** 1994. Effect of zinc and iron deficiency on phytosteroid release in wheat genotypes differing in zinc efficiency. *J Plant Nutr*, 17:1-17.
- Carbonell AA, Aarabi MA, DeLaune RD, Gambrell RP, Patrick WHJ.** 1998. Arsenic in wetland vegetation: availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. *Sci Total Environ*, 217:189-199.
- Cargnelutti D, Tabaldi LA, Spanevello RM, de Oliveira Jucoski G, Battisti V, Redin M, ... Schetinger MRC.** 2006. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere*, 65:999-1006.
- Cervilla LM, Blasco B, Ríos JJ, Romero L, Ruiz JM.** 2007. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Ann Bot-London*, 100:747-756.
- Chaney RL.** 1993. Zinc phytotoxicity. *In Zinc in Soils and Plants*. Robson AD (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 131-150.
- Chatterjee C, Nautiyal N.** 2001. Molybdenum stress affects viability and vigor of wheat seeds. *J Plant Nutr*, 24:1377-1386.
- Choi SY, Baek EM, Lee SY.** 1996. An Arabidopsis cDNA induced under cadmium stress is homologous to sequences present in the plants DNA binding proteins. *Mol Cells*, 6:429-435.
- Ciscato M, Valcke R, Loven K, Clijsters H, Navari-Izzo F.** 1997. Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. *Physiol Plantarum*, 100:901-908.
- Clairmont KB, Hagar WG, Davis EA.** 1986. Manganese toxicity to chlorophyll synthesis in tobacco callus. *Plant Physiol*, 80:291-293.
- Clijsters H, Van Assche F.** 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth Res*, 7:31-40.
- Costa G, Morel JL.** 1994. Efficiency of H⁺-atpase activity on cadmium uptake by four cultivars of lettuce. *J Plant Nutr*, 17:627-637.
- Das P, Samantaray S, Rout GR.** 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environ Pollut*, 98:29-36.
- De Dorlodot S, Lutts S, Bertin P.** 2005. Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. *J Plant Nutr*, 28:1-20.
- De Filippis LF, Ziegler H.** 1993. Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. *J Plant Physiol*, 142:167-172.
- Di Salvatore M, Carafa AM, Carratu G.** 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73:461-464.
- Doncheva S.** 1998. Copper-induced alterations in structure and proliferation of maize root meristem cells. *J Plant Physiol*, 153:482-487.

- Dousset S, Morel JL, Wiart J.** 1999. Influence du chaulage sur la biodisponibilité des éléments métalliques en trace incorporés au sol lors de l'épandage de boues de stations d'épuration. *Étude et Gestion des Sols*, 6:105-114.
- Ebbs SD, Kochian LV.** 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. *J Environ Qual*, 26:776-781.
- Eraslan F, Inal A, Savasturk O, Gunes A.** 2007. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Sci Hortic-Amsterdam*, 114:5-10.
- Espen L, Pirovano L, Cocucci SM.** 1997. Effects of Ni²⁺ during the early phases of radish (*Raphanus sativus*) seed germination. *Environ Exp Bot*, 38:187-197.
- Fjällborg B, Ahlberg G, Nilsson E, Dave G.** 2005. Identification of metal toxicity in sewage sludge leachate. *Environ Int*, 31:25-31.
- Fjällborg B, Li E, Nilsson B, Dave G.** 2006. Toxicity identification evaluation of five metals performed with two organisms (*Daphnia magna* and *Lactuca sativa*). *Arch Environ Con Tox*, 50:196-204.
- Fodor E, Szabó-Nagy A, Erdei L.** 1995. The Effects of Cadmium on the Fluidity and H⁺-ATPase Activity of Plasma Membrane from Sunflower and Wheat Roots. *J Plant Physiol*, 147:87-92.
- Fontes RLF, Cox FR.** 1998. Zinc toxicity in soybean grown at high iron concentration in nutrient solution. *J Plant Nutr*, 21:1723-1730.
- Foy CD, Weil RR, Coradetti CA.** 1995. Differential manganese tolerances of cotton genotypes in nutrient solution. *J Plant Nut*, 18:685-706.
- Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales EP, Zawoznik MS, Groppa MD, Benavides MP.** 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environ Exp Bot*, 83:33-46.
- Gajewska E, Skłodowska M, Słaba M, Mazur J.** 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biol Plantarum*, 50:653-659.
- Ganmore-Neumann R, Bar-Yosef B, Shanzer A, Libman J.** 1992. Enhanced iron (Fe) uptake by synthetic siderophores in corn roots. *J Plant Nutr*, 15:1027-1037.
- Goldberg S, Shouse PJ, Lesch SM, Grieve CM, Poss JA, Forster HS, Suarez DL.** 2003. Effect of high boron application on boron content and growth of melons. *Plant Soil*, 256:403-411.
- Goldbold DJ, Hutterman A.** 1986. The uptake and toxicity of mercury and lead to spruce (*Picea abies*) seedlings. *Water Air Soil Pollut*, 31:509-515.
- Gonnelli C, Galardi F, Gabbrielli R.** 2001. Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. *Physiol Plantarum*, 113:507-514.
- González A, Lynch JP.** 1999. Subcellular and tissue Mn compartmentation in bean leaves under Mn toxicity stress. *Functional Plant Biology*, 26:811-822.
- Göransson A.** 1993. Growth and nutrition of small *Betula pendula* plants at different relative addition rates of iron. *Trees*, 8:31-38.
- Gunes A, Soylemezoglu G, Inal A, Bagci EG, Coban S, Sahin O.** 2006. Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. *Sci Hortic-Amsterdam*, 110:279-284.

- Guo J, Dai X, Xu W, Ma M.** 2008. Overexpressing *GSH1* and *AsPCS1* simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, 72:1020-1026.
- Gupta M, Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H.** 1999. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plantarum*, 106:262-267.
- Hagemeyer J.** 1999. Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress. *In Heavy Metal Stress in Plants: from Molecules to Ecosystems*. Prasad MNV, Hagemeyer J (Eds.), Springer, Berlin, 139-156.
- Haghiri F.** 1973. Cadmium uptake by plants. *J Environ Qual*, 2:93-95.
- Hamasaki T, Nagase H, Yoshioka Y, Sato T.** 1995. Formation, distribution, and ecotoxicity of methylmetals of tin, mercury, and arsenic in the environment. *Crit Rev Environ Sci Tec*, 25 :45-91.
- Haouala F, Ferjani H, El Hadj SB.** 2007. Effet de la salinité sur la répartition des cations (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}) et du chlore (Cl^-) dans les parties aériennes et les racines du ray-grass anglais et du chiendent. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 11:235-240.
- Hegedüs A, Erdei S, Horváth G.** 2001. Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci*, 160:1085-1093.
- Hernandez LE, Carpena-Ruiz R, Garate A.** 1996. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium 1. *J Plant Nutr*, 19:1581-1598.
- Herrera-Rodríguez MB, González-Fontes A, Rexach J, Camacho-Cristóbal JJ, Maldonado JM, Navarro-Gochicoa MT.** 2010. Role of boron in vascular plants and response mechanisms to boron stresses. *Plant Stress*, 4:115-122.
- Hewitt EJ.** 1953. Metal Interrelationships in Plant Nutrition I. Effects of some metal toxicities on sugar beet, tomato, oat, potato, and marrowstem kale grown in sand culture. *J Exp Bot*, 4:59-64.
- Hirsch MP.** 1998. Availability of sludge-borne silver to agricultural crops. *Environ Toxicol Chem*, 17:610-616.
- Horiguchi T.** 1988. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants: IV. Effects of silicon on alleviation of manganese toxicity of rice plants. *Soil Sci Plant Nutr*, 34:65-73.
- Horst WJ.** 1988. The physiology of manganese toxicity. *In Manganese in soils and plants*. Foy CD, Scott BJ, Fisher (Eds.), Springer, Netherlands, 175-188.
- Huang CY, Bazzaz FA, Vanderhoef LN.** 1974. The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. *Plant Physiol*, 54:122-124.
- Inaba S, Takenaka C.** 2005. Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts. *Environ Int*, 31:603-608.
- Inouhe M, Ninomiya S, Tohoyama H, Joho M, Murayama T.** 1994. Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono- and dicotyledonous plants. *J Plant Res*, 107:201-207.
- Juste C, Chassin P, Gomez A, Linères M, Mocquot B, Feix I, Wiart J.** 1995. Les micropolluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines. Collection Valorisation agricole des boues d'épuration, Connaître pour agir, Guides et Cahiers Techniques, ADEME, Angers, 209p.

- Juwarkar AS, Shende GB.** 1986. Interaction of Cd-Pb effect on growth yield and content of Cd, Pb in barley. *Indian J Environ Health*, 28:235-243
- Kabata-Pendias A, Pendias H.** 2001. Trace Elements in Soils and Plants (3rd ed.), CRC Press, Boca Raton, 331p.
- Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D.** 1995. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants (implications to oxidative stress). *Plant Physiol*, 107:725-735.
- Kastori R, Plesnicar M, Sakac Z, Pankovic D, Arsenijevic-Maksimovic I.** 1998. Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. *J Plant Nut*, 21:75-85.
- Khan S, Khan NN.** 1983. Influence of lead and cadmium on the growth and nutrient concentration of tomato (*Lycopersicum esculentum*) and egg-plant (*Solanum melongena*). *Plant Soil*, 74:387-394.
- Kitao M, Lei TT, Koike T.** 1997. Effects of manganese toxicity on photosynthesis of white birch (*Betula platyphylla* var. japonica) seedlings. *Physiol Plantarum*, 101:249-256.
- Kochian LV.** 1993. Zinc Absorption from hydroponic solutions by plant roots. *In Zinc in soils and plants*. Robson AD (Ed.), Kluwer Acad Publish, 55.
- Kumar CV, Pascual R, Sayer M.** 1992. Crystallization of sputtered lead zirconate titanate films by rapid thermal processing. *J Appl Phys*, 71:864-874.
- Küpper H, Küpper F, Spiller M.** 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J Exp Bot*, 47:259-266.
- Kuriakose SV, Prasad MNV.** 2008. Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. *Plant Growth Regul*, 54:143-156.
- L'Huillier L.** 1997. Mécanismes d'action toxique du nickel chez le maïs. *Écologie des Milieux sur Roches Ultramafiques et sur Sols Métallifères*, 215-222.
- Langheinrich U, Tischner R, Godbold DL.** 1992. Influence of a high Mn supply on Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedlings in relation to the nitrogen source. *Tree Physiol*, 10:259-271.
- Le Bot J, Kirkby EA, Van Beusichem ML.** 1990. Manganese toxicity in tomato plants: Effects on cation uptake and distribution. *J Plant Nutr*, 13:513-525.
- Lefèvre I, Marchal G, Corréal E, Zanuzzi A, Lutts S.** 2009. Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop. *Plant Growth Reg*, 59:1-11.
- Lewis S, Donkin ME, Depledge MH.** 2001. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquat Toxicol*, 51:277-291
- Ling HQ, Koch G, Bäumlein H, Ganai MW.** 1999. Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *P Natl Acad Sci*, 96:7098-7103.
- Liu D, Jiang W, Zhang L, Li L.** 2000. Effects of boron ions on root growth and cell division of broadbean (*Vicia faba* L.). *Israel J Plant Sci*, 48:47-51.
- Loué A.** 1993. Oligo-éléments en agriculture. Nathan, Paris, 577p.
- Marin AR, Pezeshki SR, Masschelen PH, Choi HS.** 1993. Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *J Plant Nut*, 16:865-880.
- Marschner H.** 1986. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, 674p.

- Marschner H.** 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd Ed. Academic Press, London, 889p.
- Marschner H.** 2012. Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd Ed. Academic Press, London, 672p.
- Marschner H, Römheld V.** 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil*, 165:261-274.
- Mathys W.** 1975. Enzymes of Heavy-Metal-Resistant and Non-Resistant Populations of *Silene cucubalus* and Their Interaction with Some Heavy Metals in vitro and in vivo. *Physiol Plantarum*, 33:161-165.
- McGrath SP, Mico C, Curdy R, Zhao FJ.** 2010. Predicting molybdenum toxicity to higher plants: Influence of soil properties. *Environ Pollut*, 158:3095-3102.
- McFarlane GR, Burchett MD.** 2001. Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Mar Pollut Bull*, 42:233-240.
- Meharg AA.** 1994. Integrated tolerance mechanisms: Constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell & Environ*, 17:989-993
- Meharg AA, Hartley-Whitaker J.** 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol*, 154:29-43
- Mengel K, Kirkby E.** 1987. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute. 685 p.
- Messer RLW, Lockwood PE, Tseng WY, Edwards K, Shaw M, Caughman GB, Lewis JB, Wataha JC.** 2005. Mercury (II) alters mitochondrial activity of monocytes at sublethal doses via oxidative stress mechanisms. *J Biomed Mater Res Part B*, 75:257-263.
- Mikelova R, Baloun J, Petrlova J, Adam V, Havel L, Petrek J, Horna A, Kizek R.** 2007. Electrochemical determination of Ag-ions in environment waters and their action on plant embryos. *Bioelectroch*, 70:508-518.
- Miller JE, Hassat JJ, Koeppe DE.** 1975. The effect of soil properties and extractable lead levels on lead uptake by soybean *Commun Soil Sci Plant Annal*, 6:339-347.
- Mitchell GA., Bingham FT, Page AL.** 1978. Yield and metal composition of lettuce and wheat grown on soils amended with sewage sludge enriched with cadmium, copper, nickel, and zinc. *J Environ Qual*, 7:165-171.
- Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK.** 2007. Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Environ Toxicol*, 22:368-374.
- Monnet F, Vaillant N, Vernay P, Coudret Al, Sallanon H, Hitmi A.** 2001. Relationship between PSII activity, CO₂ fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *J Plant Physiol*, 158:1137-1144.
- Monteiro MS., Santos C, Soares AMVM, Mann RM.** 2009. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotox Environ Saf*, 72:811-818.
- Mrozek EJ, Funicelli NA.** 1982. Effect of zinc and lead on germination of *Spartina alterniflora* loisel seeds at various salinities. *Environ Exp Bot*, 22:23-32.
- Mukherji S, Maitra P.** 1976. Toxic effects of lead on growth & metabolism of germinating rice (*Oryza sativa* L.) seeds & on mitosis of onion (*Allium cepa* L.) root tip cells. *Indian J Exp Biol*, 14:519-521.
- Naaz S, Pandey SN.** 2010. Effects of industrial waste water on heavy metal accumulation, growth and biochemical responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J Environ Biol*, 31:273-276.
- Nable OR, Bañuelos GS, Paull JG.** 1997. Boron toxicity. *Plant Soil*, 193:181-198.

- Nakos G.** 1979. Fate of lead in the soil and its effects on *Pinus halepensis*. Plant Soil, 53:427-443.
- Nautiyal N, Chatterjee C.** 2004. Molybdenum stress-induced changes in growth and yield of chickpea. J Plant Nutr, 27:173-181.
- Ndzomo GT, Ndoumou DO, Awah MT.** 1994. Effect of Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ on H⁺/K⁺ fluxes in excised *Pistia stratiotes* roots. Biol Plantarum, 36:591-597.
- Ölçer H, Kocaçaliskan I.** 2007. Excess boron reduces polyphenol oxidase activities in embryo and endosperm of maize seed during germination. J Biosci, 62:111-115.
- Ouariti O, Boussama N, Zarrouk M, Cherif A, Ghorbal MH.** 1997. Cadmium and copper-induced changes in tomato membrane lipids. Phytochemistry, 45:1343-1350.
- Ouzounidou G, Symeonidis L, Babalonas D, Karataglis S.** 1994. Comparative Responses of a Copper-tolerant and a Copper-sensitive Population of *Minuartia hirsuta* to Copper Toxicity. J Plant Physiol, 144:109-115.
- Ouzounidou G, Moustakas M, Eleftheriou EP.** 1997. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Arch Environ Con Tox, 32:154-160.
- Ozden Y, Kutbay HG.** 2009. Toxicity of copper, cadmium, nickel, lead and zinc on seed germination and seedling growth in *Eruca sativa*. Fresen Environ Bull, 18:26-31.
- Påhlsson AMB.** 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. Water Air Soil Poll, 47:287-319.
- Pandey N, Sharma CP.** 2002. Effect of heavy metals Co²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ on growth and metabolism of cabbage. Plant Sci, 163:753-758.
- Pandolfini T, Gabbrielli R, Comparini C.** 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. Plant Cell Environ, 15:719-725.
- Parent LO, Rivest R.** 2003. Les éléments nutritifs. In Le Guide de Fertilisation. CRAAQ (Ed.), Québec, 294 p.
- Patterson WA III, Olson JJ.** 1983. Effects of heavy metals on radicle growth of selected woody species germinated on filter paper, mineral and organic soil substrates. Can J Forest Res, 13:233-238.
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A.** 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. Environ Exp Bot, 52:199-223.
- Piccini DF, Malavolta E.** 1992. Effect of nickel on two common bean cultivars. J Plant Nutr, 12 :2343-2350.
- Piri K.** 1991. Contribution à la sélection in vitro de plantes androgéniques de blé pour leur tolérance au NaCl. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.
- Prasad KVSK, Paradha Saradhi P, Sharmila P.** 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. Environ Exp Bot, 42:1-10.
- Prasad MNV, Strzałka K.** 1999. Impact of heavy metals on photosynthesis. In Heavy metal stress in plants. Prasad MNV (Ed.), Springer, Berlin, 117-138.
- Rahman H, Sabreen S, Alam S, Kawai S.** 2005. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. J Plant Nutr, 28:393-404.
- Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Gárate A.** 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. Plant Sci, 162:761-767.

- Ratte, HT.** 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environ Toxicol Chem*, 18:89-108.
- Reddy AM, Kumar SG, Jyothsnakumari G, Thimmanaik S, Sudhakar C.** 2005. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*, 60:97-104.
- Reid R.** 2007. Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant Cell Physiol*, 48:1673-1678.
- Römheld V, Marschner H.** 1990. Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. *Plant Soil*, 123:147-153
- Romney EM, Wallace A, Alexander GV.** 1975. Responses of bush bean and barley to tin applied to soil and to solution culture. *Plant Soil*, 42:585-589.
- Ros R, Cook DT, Martinez-Cortina C, Picazo I.** 1992. Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and proton-pumping of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bahia) shoots. *J Exp Bot*, 43:1475-1481.
- Rout GR, Samantaray S, Das P.** 2001. Aluminium toxicity in plants: a review. *Agronomie*, 21:3-21.
- Samantaray S, Rout GR, Das P.** 1997. Tolerance of rice to nickel in nutrient solution. *Biol Plantarum*, 40:295-298.
- Sanita di Toppi L, Gabbrielli R.** 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot*, 41:105-130.
- Schmöger, MEV.** 2001. Phytochelatin: Complexation of Metals and Metalloids, Studies on the Phytochelatin Synthase. PhD Thesis ès Natural Sciences, Munich University of Technology.
- Shanker AK, Djanaguiraman M, Pathmanabhan G, Sudhagar R, Avudainayagam S.** 2003. Uptake and phytoaccumulation of chromium by selected tree species. Proceedings of the International Conference on Water and Environment held in Bhopal, M.P. India.
- Sheldon AR, Menzies NW.** 2005. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant Soil*, 278:341-349.
- Siddiqui S, Meghvansi MK, Wani MA, Jabee F.** 2009. Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L. *Acta Physiol Plant*, 31:531-536.
- Sinha S, Gupta M, Chandra P.** 1997. Oxidative Stress Induced by Iron in *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle: Response of Antioxidants. *Ecotoxicol Environ Saf*, 38:286-291.
- Smith FA.** 1973. The internal control of nitrate uptake into excised barley roots with differing salt contents. *New Phyto*, 72:769-782.
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK.** 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaesolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol Plant*, 85:85-89.
- Stadtman ER, Oliver CN.** 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem*, 266:2005-2008.
- Stiborova M, Doubnowova M, Brezinova A, Friedrich A.** 1986. Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum ulgare* L.), *Photosynthetica*, 20:418-425.

- Sudhakar C, Symalabai L, Veeranjaveyuler K.** 1992. Lead tolerance of certain legume species grown on lead or tailing. *Agri Eco Environ*, 41:253–261.
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK.** 2003. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell*, 15:1263-1280.
- Tanaka M, Fujiwara T.** 2008. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflügers Arch EJP*, 456:671-677.
- Tukendorf A, Skórzyńska-Polit E, Baszyński T.** 1997. Homophytochelatins accumulation in Cd-treated runner bean plants is related to their growth stage. *Plant Sci*, 129:21-28.
- Vaillant N, Monnet F, Hitmi A, Sallanon H, Coudret A.** 2005. Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere*, 59:1005-1013.
- Van Assche F, Clijsters H.** 1986. Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: Effect on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J Plant Physiol*, 125:355-360.
- Weinstein LH.** 1977. Fluoride and plant life. *J Occup Environl Med*, 19:49-78.
- Wojcik M, Tukiendore A.** 2005. Cd uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biol Plant* 49:237–244.
- Wu SH.** 1994. Effect of manganese excess on the soybean plant cultivated under various growth conditions. *J Plant Nutr*, 17:991-1003.
- Xing W, Li D, Liu G.** 2010. Antioxidative responses of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John to short-term iron exposure. *Plant Physiol Bioch*, 48:873-878.
- Xue Z, Gao H, Zhao S.** 2014. Effects of cadmium on the photosynthetic activity in mature and young leaves of soybean plants. *Environ Sci Pollut Res*, 21:4656-4664.
- Yadav, SK.** 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S Afr J Bot*, 76:167-179.
- Zeid IM.** 2001. Responses of *Phaseolus vulgaris* chromium and cobalt treatments. *Biol Plantarum*, 44:111-115.
- Zhang WH, Tyerman SD.** 1999. Inhibition by HgCl₂ of water channels in intact wheat root cells. *Plant Physiol*, 120:849-857.
- Zhou ZS, Huang SQ, Guo K, Mehta SK, Zhang PC, Yang ZM.** 2007. Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *J Inorg Biochem*, 101:1-9.
- Zornoza P, Robles S, Martin N.** 1999. Alleviation of nickel toxicity by ammonium supply to sunflower plants. *Plant Soil*, 208:221-226.

GLOSSAIRE¹

A

Absorption

Processus chimique ou biologique permettant l'incorporation d'une substance chimique dans un organisme vivant.

Additivité

Action combinée des composants, qui n'interagissent pas entre eux, d'un mélange dont l'effet observé, éventuellement toxique, correspond à la toxicité prévue par le modèle d'additivité (somme des effets individuels des composants seuls). On parle alors d'additivité stricte.

Adsorption

Phénomène par lequel une espèce chimique peut se fixer à la surface d'un solide, à son interface avec l'air, l'eau ou tout autre fluide gazeux ou liquide.

Akène

Fruit sec non déhiscent (ne s'ouvre pas spontanément), ne renfermant qu'une semence (graine), indépendante des parois (péricarpe) du fruit.

Angiosperme

Plante vasculaire à fleurs portant des semences à l'intérieur d'un ovaire (*aggeion* = capsule ; *spermos* = semence, graine).

Annuelle

Se dit d'une plante qui réalise son cycle complet en une seule année : germination des **semences**, croissance, émergence d'une **fleur**, dépérissement, dispersion de semences, germination des semences... Ces plantes sont également thérophytes (*théros* = la belle saison ; *phytos* = la plante) car elles survivent à la mauvaise saison sous forme de semences.

Antagonisme

Phénomène de neutralisation d'un effet toxique par un autre produit toxique.

Astéracées

Importante famille de plantes **dicotylédones** (~13000 espèces) essentiellement **herbacées** (réparties en 1500 genres). Ces plantes ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en **capitules**, serrées les unes à côté des autres, sans **pédoncule**, placées sur

¹ Sources principales :

Ramade F. 2008. Dictionnaire Encyclopédique des Sciences de la Nature et de la Biodiversité. Dunod, Paris, 726p.
Campbell NA, Reece JB. 2004. Biology. 7th edition. De Boeck, 1364p.

l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des **bractées** florales.

Autofécondation

Fécondation d'un gamète femelle (ovule) par un gamète mâle (spermatozoïde, pollen) d'un même individu.

Autogame

Se dit d'une espèce vivante (animale ou végétale) qui se reproduit par **autofécondation**.

B

Bioaccumulation

Processus d'absorption par lequel les êtres vivants peuvent accumuler des substances nutritives, toute substance présente naturellement dans son environnement ou encore une substance polluante (naturelle ou synthétique), quelle que soit la voie d'exposition.

Bioamplification (ou biomagnification)

Phénomène de transfert et d'amplification biologique, résultant de la bioaccumulation, par lequel une substance polluante présente dans un écosystème connaît un accroissement de sa concentration le long de la chaîne trophique.

Biocénose (ou biocoenose)

Totalité des être vivants qui peuplent un écosystème.

Biodisponibilité

Fraction de la quantité totale d'un **polluant** chimique dans le milieu étudié absorbable par des producteurs primaires (végétaux), consommateurs (animaux) et/ou décomposeurs (bactéries et champignons) : elle est prélevée par un organisme vivant, métabolisée, stockée et transférée vers le niveau trophique supérieur.

Bio-essai (ou bio-test)

Expérience (test ou essai) biologique réalisé *ex situ*, dont l'objectif principal est de déterminer la toxicité et/ou l'écotoxicité d'une substance chimique, d'un facteur physique ou d'un élément biologique.

Biotope

Dimensions physiques et spatiales d'un écosystème.

Bio-marqueur

Changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passé d'un individu à au moins une substance à caractère polluant.

Bractée

Feuille modifiée (forme, couleur, taille...) composant une pièce florale à la base de l'**inflorescence** et/ou du pédoncule.

C

Capitule

Type d'inflorescence composée de fleurs insérées sur la partie sommitale d'un pédoncule élargi, donnant ainsi l'impression de ne former qu'une seule et même fleur (*e.g.* marguerite, tournesol...).

Carbone Organique Total COT

Quantité de carbone constituant tous les composés organiques présents dans un échantillon donné. Le COT est un indice non spécifique de la qualité de l'eau, d'un effluent. Le COT, en relation avec la DCO, renseigne sur le type et l'origine des contaminations organiques.

Colloïde

Se dit d'un ensemble dans lequel des particules, dont la taille n'excède pas 1000 nm, sont suspendues dans un fluide.

Cotylédon

Chez les **Angiospermes**, désigne la (les) feuille(s) primordiale(s) dont l'élaboration commence dès la fécondation et qui porte la plantule dès la germination.

Croissance

Accroissement de la taille d'un individu au cours de son développement.

D

Demande Biologique en Oxygène DBO

Quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation de la matière organique contenue dans un litre d'effluent, par voie *biologique* (microorganismes). La DBO est un indice de pollution des eaux permettant d'estimer la fraction biodégradable de la charge polluante d'un effluent.

Demande Chimique en Oxygène DCO

Quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation *chimique* des substances organiques et minérales dans un litre d'effluent. La DCO est un indice permettant d'évaluer la charge polluante totale d'un effluent.

Dicotylédone

Sous-classe de **Spermaphytes** dont l'embryon est pourvu de deux cotylédons.

Dormance

Etat de vie ralentie. Chez les animaux on parle d'hivernage ; chez les Mammifères, on parle plus particulièrement d'hibernation.

E

Ecotoxicité

Evaluation du degré écotoxique d'un produit.

Ecotoxicologie

Etude des effets négatifs (symptômes, mécanismes d'action...) de produits polluants, naturels ou synthétiques, sur l'ensemble des êtres vivants d'un écosystème donné, à tous les niveaux d'intégration (de l'individu à l'écosystème entier). L'écotoxicologie est un outil très important pour les politiques d'évaluation des risques environnementaux actuels

Eutrophisation

Phénomène d'enrichissement des eaux continentales ou littorales en sels minéraux nutritifs et/ou en matière organique d'origine naturelle, mais souvent accéléré voire induit par une pollution des eaux par le rejet d'effluents urbains, agricoles ou industriels. On parle plutôt dans ce cas d'hyper-eutrophisation ou de dystrophisation.

Ecologie

Terme initialement défini par Haeckel (biologiste allemand, 1834-1919) qui signifie étymologiquement parlant la science (*logos*) de l'habitat (*oikos*). Plus largement, l'écologie est la science globale (holistique) dont l'objet est l'étude d'un écosystème considéré comme un tout, intégrant ainsi l'étude des relations des êtres vivants entre eux et avec leur environnement.

Ecosystème

Ensemble formé par l'association de populations ou de communautés d'êtres vivants (animales, végétales et microorganiques), la biocénose, de leur environnement physicochimique (température, salinité, hygrométrie, composition des sols ou sédiments...), le biotope, et des relations d'inter-dépendances qui permettent le développement et le maintien de la vie.

Effluent

Eau (domestique, industrielle ou agricole) *éventuellement* traitée, on parle alors de rejet, avant d'être rejetée dans le milieu naturel ou en station d'épuration. Ainsi, un rejet est un effluent, mais un effluent n'est pas forcément un rejet.

G

Germination

Ensemble des processus physiologiques et réactions biochimiques par lesquelles les semences ("graines") entrent en vie végétative.

Graine

voir *Semence*

Gymnosperme

Plante vasculaire à semences nues (embryon entouré d'un tissu de protection seul).

H

Herbacée

Type de plante dont le tissu végétal reste vert, peu consistant et ne développe pas de tige ligneuse permanente.

I

Inflorescence

Disposition des fleurs sur la tige d'une plante à fleurs. L'inflorescence est souvent caractéristique d'une famille.

Inductively Coupled Plasma ICP

Technique instrumentale d'analyse chimique basée sur la séparation, l'identification et la quantification quasi-simultanée d'éléments chimiques composant un échantillon en fonction de leur masse. Différents modes opératoires sont possibles, comme l'ICP-ME (ICP *Mass Spectrometry*) ou l'ICP AES (ICP *Atomic Emission Spectrometry*).

L

Lixiviat (ou percolat)

Liquide résiduel issu de la percolation d'eau à travers un matériau solide (du latin *lixivius* = eau de lessive). Les lixiviats sont souvent source de pollution des sols et des eaux (souterraines ou de surface), et font l'objet de mesures et de normes strictes.

M

Micro-, Méso-, et Macro- cosme

Petit, moyen et grand systèmes complexes (en général, multispécifiques), dans lesquels les paramètres physiques et biologiques peuvent être modulés individuellement et les effets de ces modulations mesurés. Ces tests peuvent être *in* ou *ex situ*, et tendent à reproduire les réponses des organismes vivants de façon plus réalistes que les tests monospécifiques.

P

Parthénogenèse

Phénomène de reproduction sexuée en l'absence de mâles. Il existe plusieurs types de parthénogénèse selon la fréquence (accidentelle, facultative, obligatoire) et selon le sexe de la descendance.

Perturbateur endocrinien (ou *disrupteur endocrinien*)

Molécule chimique complexe mimant (agoniste), bloquant (antagoniste) ou modifiant (interférant) l'action d'une ou de plusieurs hormones perturbant ainsi, à plus ou moins long

terme et à très faibles doses, l'équilibre et le fonctionnement normal d'un organisme, animal ou végétal, voire de sa descendance. Bien qu'il puisse être d'origine naturelle, un perturbateur endocrinien est principalement créé et synthétique par les activités anthropiques.

Plantule (ou *plantlet*)

Jeune plante qui se développe encore en puisant dans les réserves cotylédonaires.

Pollution

Perturbation ou dégradation d'un écosystème à la suite de l'action directe ou indirecte de l'Homme. Il existe trois types de pollutions : physique (rayonnement ionisant, caléfaction, luminosité...), chimique (émission de substances métalliques, organiques, naturelles, synthétiques...) et biologiques (espèces pathogènes, invasives, génétiquement modifiées...).

Polluant

Élément chimique, physique ou biologique, naturel ou synthétique, générant une perturbation d'un écosystème, dont l'intensité et la durée dépend de nombreux facteurs, comme la nature du polluant, la quantité émise dans le système, ou encore la fréquence d'émission.

Pédoncule

Pièce florale qui porte les fleurs puis les fruits d'une plante ; aussi appelée « queue ».

Phytotoxicité

Désigne la toxicité d'un produit polluant envers la flore.

R

Rejet

Eau (domestique, industrielle ou agricole) *obligatoirement* traitée avant d'être rejetée dans le milieu naturel ou en station d'épuration. Un rejet est un **effluent** traité.

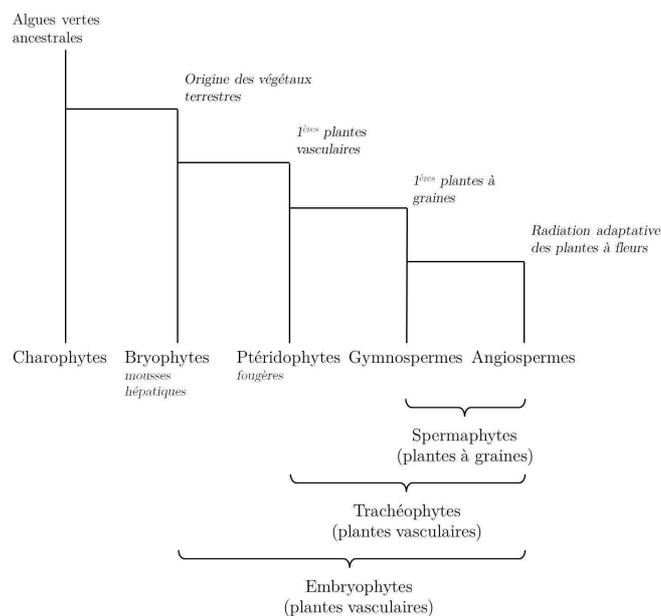
S

Semence (ou graine)

Structure multicellulaire, résistante et complexe, produit chez les Spermaphytes de l'évolution de l'ovule fécondé. La semence (graine) renferme dans une enveloppe protectrice l'embryon et un important tissu de réserve nutritive (endosperme). Chez les **Gymnospermes** les semences sont nues (absence de cavité protectrice), alors qu'elles sont encapsulées dans l'ovaire chez les Angiospermes.

Spermaphyte

Embranchement des plantes à graines/semences (*spermos* = graine, *phyta* = plante), dont les organes reproducteurs sont apparents et développés. La reproduction se fait directement par les gamétophytes et non plus par des sporophytes.



Stochastique (effet)

Par opposition aux effets *déterministes*, les effets stochastiques n'apparaissent pas selon le principe d'une cause induisant toujours le même effet. Ils concernent par exemple les conséquences de faibles doses de produits toxiques.

Stœchiométrie

Du grec *stoikheion*, l'élément, et *metron*, la mesure, et d'après JB Richter, la stœchiométrie est la science qui mesure les proportions quantitatives ou rapports de masse dans lesquels les éléments chimiques sont impliqués.

Synergie

Phénomène par lequel plusieurs éléments (physique, chimiques), (ré)agissent de façon similaire, générant un effet supérieur à la somme des effets individuels de chaque élément en action.

T

Toxicité

Evaluation du degré toxique d'un élément (chimique, physique ou biologique) à provoquer des effets délétères à tout niveau d'organisation (moléculaire, cellulaire, organique, systémique...), pour toute forme de vie. On peut distinguer (selon les définitions, les auteurs) différents types de toxicité : aigüe, chronique, subaigüe et à long terme.

Toxicologie

Science de l'étude des effets des poisons (polluants, toxines...) principalement axée sur leurs effets sur l'Homme.

X

Xénobiotique

Toute substance *synthétique* caractérisée par une forte toxicité à faible concentration.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles *in press*

- “Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater : A review of options for their elimination”

Arabian Journal of Chemistry

Priac A, Morin-Crini N, Druart C, Gavaille S, Bradu C, Lagarrigue C, Torri G, Winterton P, Crini G.

- “Ecotoxicity evaluation of industrial discharge waters and metallic solutions using two organisms (*Lactuca sativa* and *Daphnia magna*)”

Journal of Pollution Effects and Control

Priac A, Poupeney A, Druart C, Crini G.

Article soumis

- “Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters”

Comptes Rendus Biologiques

Priac A, Badot PM, Crini G.

Article en préparation

- “Differential uptake of trace element in two *Lactuca sativa* varieties”

Priac A, Morin-Crini N, Alaoui-Sossé B, Crini G.

Communications orales

- **Aqualife 2012 – 5 et 6 juin 2012 – Kiel, Allemagne (Poster Spotlight)**

“Evaluation of the ecotoxicity of synthetic and industrial polycontaminated solutions based on bioassays with *Lactuca sativa*.”

A. Priac, B. Sancey, J. Charles, N. Morin-Crini, P.M. Badot, M. de Carvalho, X. Hutinet, S. Gavaille, C. Bradu, G. Torri & G. Crini.
- **XV^e Journée Cyclodextrines – 4 et 5 avril 2013 – Montpellier, France**

“Cross linked cyclodextrins and industrial pollutant removal: chemical sorption and environmental effects.”

A. Priac & G. Crini.
- **XIX^e Forum des Jeunes Chercheurs FJC – 13 et 14 juin 2013 – Dijon, France**

“Réévaluation du test de germination de *L. sativa*.”

A. Priac, P.M. Badot & G. Crini.
- **Réunion Annuelle de la Société Biologique de Besançon SBB – 12 décembre 2013 – Besançon, France**

“*Lactuca sativa* : un outil biologique pertinent dans l'évaluation de la phytotoxicité d'effluents polycontaminés.”

A. Priac & G. Crini.
- **XX^e Forum des Jeunes Chercheurs FJC – 23 et 24 juin 2014 – Besançon, France**

“Accumulation différentielle d'ETM entre variétés de laitue *Lactuca sativa*.”

A. Priac, N. Morin-Crini, B. Alaoui Sossé & G. Crini.
- **Colloque de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée SEFA – 1 et 2 juillet 2014 – Besançon, France**

“Accumulation différentielle d'ETM entre deux variétés de laitue *Lactuca sativa*.”

A. Priac, N. Morin-Crini, B. Alaoui Sossé & G. Crini.

Communications posters

- **5th European Symposium Polymerix 2012 – 31 mai et 1^{er} juin 2012 – Rennes, France**

“Pollutant removal from industrial effluents using sorption onto cross linked polysaccharides.”

A. Priac, N. Morin-Crini, S. Gavaille, C. Bradu, E. Vismara, B. Sancey, J. Charles, M. de Carvalho, X. Hutinet, F. Degiorgi, P.M. Badot, G. Torri & G. Crini.
- **Colloque de la Société d’Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée SEFA– 3 et 4 juillet 2013 – Besançon, France**

“*Lactuca sativa* : un bio-indicateur pour l’évaluation de l’impact de rejets industriels – Mise au point méthodologique.”

A. Priac & G. Crini.
- **Society of Environmental Toxicology and Chemistry SETAC Europe 24th Meeting – 11 au 15 mai 2014 – Basel, Suisse**

“Phytotoxicity assessment of discharge waters : Focus on germination and root elongation tests.”

A. Priac, P.M. Badot, S. Gavaille & G. Crini.

RESUME

Ce travail de thèse a concerné l'évaluation des impacts écotoxicologiques de rejets industriels complexes issus de la filière du traitement de surface et de solutions synthétiques mono- et polycontaminées sur la laitue *Lactuca sativa* L. Il est ainsi montré que les résultats des tests écotoxicologiques de germination des semences de laitue reflètent la variabilité de la composition chimique des rejets et de leur amélioration après traitement d'abattement de la charge métallique et/ou organique. Ces tests ont également permis de classer selon leur toxicité croissante certains ETM (Fe, Cr, Co, Cu, B, Al, F, Ni, Cd, Ag, Zn, Sn) et quelques molécules organiques (4NP, NAP, DBP, NP9). En revanche, quelle que soit la qualité chimique du rejet testé, les taux de germination des semences et les élongations des plantules (principalement les longueurs racinaires) dépendent de la variété de laitue choisie pour le test. Cette observation s'applique aussi aux solutions synthétiques métalliques monocontaminées. Ainsi, pour un *même* rejet, la Batavia dorée de printemps apparaît plus résistante aux polluants que la Kinemontepas et la Grosse Blonde Paresseuse, et que l'Appia (CE_{50} estimées respectivement à ~99, 59, 43 et 25 %). Ces différences *intraspécifiques* s'observent également pour la composition interne et les tendances d'enrichissement en certains nutriments et ETM, malgré la présence de Cd dans le péricarpe de semences "vierges".

Mots clés : *Lactuca sativa* L., variété, ETM, rejets, test écotoxicologique, accumulation.

ABSTRACT

This thesis has explored the surface treatment DW and mono- and polycontaminated synthetic solution ecotoxicological impact assessment on lettuce *Lactuca sativa* L. Ecotoxicological seed germination bioassays reflect the DW chemical variability, their chemical improvement after metallic and/or organic abatement, and also permit to classify MTE (Fe, Cr, Co, Cu, B, Al, F, Ni, Cd, Ag, Zn, Sn) and POP (4NP, NAP, DBP, NP9) according to their increasing ecotoxicity. However, whatever the DW chemical quality, seeds germination rates and plantlets elongations (mainly root elongations) depend on lettuce variety's choice. It is also true for monometallic solutions. Thus for the *same* DW sample, the Batavia dorée de printemps variety appears to be more resistant to pollutant than the Kinemontepas and the Grosse Blonde Paresseuse varieties, and than the Appia variety (estimated EC_{50} respectively 99, 59, 43 and 25 %). Despite the presence of Cd in virgin pericarp seeds, *intraspecific* differences occurred as well when analyzing the inner plantlet compositions and the nutrients and MTE uptake patterns.

Key words : *Lactuca sativa* L., variety, MTE, discharge water, ecotoxicological bioassay, uptake.